

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**ESTUDIO DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE NUEVOS
DERIVADOS DE CANNABIGEROL Y CANNABIDIOL EN
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Francisco Javier Carrillo Salinas

Tesis Doctoral

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE NUEVOS
DERIVADOS DE CANNABIGEROL Y CANNABIDIOL EN
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Memoria presentada por

Francisco Javier Carrillo Salinas

para optar al grado de Doctor

VºBº de la Directora:

Dra. Carmen Guaza Rodríguez



Doña Carmen Guaza Rodríguez, Doctora en Ciencias Biológicas, Profesora de Investigación del Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal (CSIC)

CERTIFICA:

Que la tesis titulada “Estudio de la eficacia terapéutica de nuevos derivados de cannabigerol y cannabidiol en esclerosis múltiple”, que se recoge en la presente memoria y de la que es autor FRANCISCO JAVIER CARRILLO SALINAS, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal (CSIC) y reúne las condiciones exigidas para su defensa.

Fdo. Dra. Carmen Guaza Rodríguez

Madrid, 2016

Esta tesis doctoral ha sido financiada con las ayudas del
MINECO SAF2010-17501 e IPT-2011-0861-900000.

“Todo hombre puede ser, si se lo propone,
escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal

“El ayer es historia, el mañana es un misterio,
pero el día de hoy es un regalo. Por eso se llama
presente”

Maestro Oogway

“Un 80% de tu vida la dedicas a trabajar, pero
también quieres pasarlo bien. ¿Por qué no pasarlo
bien en el trabajo?”

Richard Branson

AGRADECIMIENTOS

Cuando hablas con amigos, muchas veces los temas derivan a lo laboral, e inevitablemente a hablar de los jefes. Muchos se quejan, pero yo me siento afortunado. Muy afortunado. Nunca podré mostrar lo eternamente agradecido que estoy a la Prof. Carmen Guaza por darme la oportunidad de formar parte de la familia del C-05. Te agradezco la bondad y el cariño con que me tratas desde el primer día, la sabiduría y el conocimiento que muestras en todo momento. Gracias por todo.

Muchos dicen que el trabajo es para trabajar, no para hacer amigos. Es difícil que de entre tus compañeros de trabajo consigas hacer amigos. Pero más difícil y extraño es que de entre tus compañeros de trabajo, encuentres a personas que más que amigos sean como tu familia. Yo he tenido esa suerte, porque encontré a Miriam y Ana. Gracias por vuestra paciencia y por todos los momentos que hemos vivido juntos, imposible de plasmar en unas líneas. Los tres mosqueteros hasta el fin del mundo.

También quisiera dar las gracias a Natalia, por su carácter obstinado e insistencia en muchos temas, por estar siempre dispuesta a ayudar, y por esa alegría desbordante con la que dibujas nuestros días.

Gracias a Asun, por la eterna sonrisa que exhibes pase lo que pase, recordándome que siempre existe un lado positivo.

Por supuesto, gracias Leyre, por dejarme ser tu sombra durante muchos meses y enseñarme cómo funciona el laboratorio, y muchas veces, la vida.

Gracias Laura, por tu ayuda, por las conversaciones y los momentos “musicales”, que hacen de esas interminables tardes algo más llevadero.

A todos los que han pasado por el C-05: Pepe, Joaquín, Andrea, Mónica, Sandra, César, Isa y Miri, por los buenos ratos juntos. A Ana y Eli, por estar ahí cuando necesitaba ayuda. Gracias al Dr. Shin, a Silvia y a Noelio, por enseñarme a ver la vida desde otro punto de vista.

Además, no me quiero olvidar del grupo tan magnífico que formamos en el Instituto Cajal con la excusa de la divulgación científica. Gracias Andrea, Ángel, Àngel, Jaime, Julián, Merce, y por supuesto a Diego, Jose, David y Adrián H. Gracias a Andrea y a María, espero que la vesiculilla formada en el máster dure mucho tiempo. Gracias a Lorenzo, por las innumerables charlas sobre ciencia. Gracias a todas las personas del Instituto Cajal que me han ayudado a conseguir este objetivo.

Qué alegría me llevé al comenzar a trabajar en el laboratorio, cuando Carmen me dijo que íbamos a colaborar con un grupo de Córdoba. Gracias a Eduardo, por tus consejos y disposición, y a Carmen, Carmen e Irene por toda vuestra entrega. Nunca colaborar con otro grupo fue tan

gratificante y recíproco.

Gracias también al formidable grupo que formamos en el curso de Neurociencia de Carmona: Jordi, Cris, Laura, Yoanna, Carmen, Miriam y Gonzalo, qué grandes momentos con selfieF.

Fuera del ámbito laboral, quisiera dar las gracias a otro grupo de personas maravillosas que hacen que los pequeños momentos sean a menudo los mejores. Gracias a Ana, María, Ángela y Julián, gracias a Cris, Jesús, Jorge, Mari Carmen, Mayi, Pedro, Rita, Susana y Vero, por todo.

Gracias a los amigos de la universidad, porque aunque nos veamos poco, siempre se puede contar con ellos: Javi, Arturo, Laura y Jonay.

También quería agradecer a Carmen, Mario, Pilar y Pablo todos los buenos ratos y las increíbles comilonas vividas.

Gracias a esas grandes tardes de fútbol con el CIB Athletic, ha sido un honor vestir la camiseta y compartir con todo el equipo las derrotas y las victorias.

Cómo no, gracias a mi familia política, Paco y Piedad, por tratarme como a un hijo más. Gracias a Paco, Marta e Inma, por todos los buenos momentos juntos.

Gracias a mi abuela Paca, por iluminarme desde el cielo todos los días.

Necesitaría un apartado especial sólo para agradecer a mi hermano José Manuel todo. Has tenido infinita paciencia conmigo, infinito saber estar, infinita amabilidad, infinita generosidad. Todo hermano puede tener una relación especial con el otro, pero los gemelos (dicigóticos) están, si cabe, más unidos. No tengo palabras para darte las gracias por todo.

Gracias a mi mujer, Zaira. Por todos los momentos que hemos vivido juntos, buenos y malos, y por la vida que tenemos por delante. Nosotros hacemos que uno más uno sea uno. Gracias por hacerme la persona más feliz cada día. Tú haces que todo cobre sentido.

Y el último gracias que quiero dar es un GRACIAS con mayúsculas, a mis padres José y Lola. Merecéis lo más grande por vuestra entrega incondicional. Todas las renunciaciones que habéis tenido que hacer por darnos lo mejor, todo el esfuerzo... gracias. Esta tesis es fruto de mi trabajo, pero sobre todo de vuestro sacrificio.

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
ACEA	Araquidonil-2-cloroetilamida
AEA	Anandamida; Araquidonoiletanolamida
AG	Acetato de glatirámero
APCs	Células presentadoras de antígeno
AraC	Citosina-D-arabinofuranósido
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CB	Receptor cannabinoide
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CREAE	Encefalitis autoinmune experimental crónica remitente
CUPID	Estudio en el uso de cannabinoides en enfermedades cerebrales inflamatorias crónicas
DA	Cepa Daniels del virus TMEV
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DCs	Células dendríticas
DEM	Desviación estándar de la media
DMF	Dimetil fumarato
DMSO	Dimetil-sulfóxido
dpi	días postinfección
dpI	días postinmunización
DTT	Dithiothreitol
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
eCB	Endocannabinoide
EM	Esclerosis múltiple
EM-PP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EM-RR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EM-SP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva

EPSCs	Corrientes postsinápticas mediadas por glutamato
ERK	Kinasa regulada por señales extracelulares
FAAH	Hidrolasa de amidas y ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FCS	Suero fetal de ternero
GPR55	Receptor 55 acoplado a proteína G
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
H/E	Hematoxilina/Eosina
HERVs	Retrovirus endógenos humanos
HHV-6	Virus del herpes humano-6
HS	Suero de caballo
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
I κ B α	Inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B α
IL	Interleuquina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
KO	<i>Knock out</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
LFA-4	Antígeno funcional de leucocito-4
LFB	Luxol Fast Blue
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
MBP	Proteína básica de mielina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MOG	Glicoproteína oligodendrocitaria de mielina
MRI	Imagen de resonancia magnética
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
NADA	N-araquidonoil-dopamina
NAPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamida
NArPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasa
NF κ B	Factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras <i>kappa</i> de las células B activadas

Nrf2	Factor de transcripción nuclear eritroide-2
O2A	Oligodendrocito-astrocito tipo 2
OEA	Oleoiletanolamida
OPCs	Células progenitoras de oligodendrocitos
PB	Tampón fosfato
PEA	Palmitoiletanolamida
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PKA	Proteína kinasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PLP	Proteína proteolipídica de mielina
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PPAR	Receptor nuclear activado por proliferadores de peroxisomas
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SFM	Medio libre de suero
SNC	Sistema nervioso central
sVCAM	Porción soluble de la molécula de adhesión celular endotelial
TCR	Receptor de células T
T _H	Linfocito T cooperativo
THC	Tetrahidrocannabinol
THCO	Tetrahidrocannabinol
THCV	Tetrahidrocannabivarina
TMEV-IDD	Encefalomiелitis murina desmielinizante inducida por el virus de Theiler
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TRP	Receptores activados por potenciales transitorios
Ufp	Unidades formadoras de placa
VCAM	Molécula de adhesión celular endotelial
VEB	Virus Epstein-Barr
VLA-4	Integrina $\alpha 4$
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>

INDICE

Agradecimientos	11
Abreviaturas	15
Resumen	25
I. Introducción	29
1. Esclerosis múltiple	31
1.1. Definición y sintomatología	31
1.2. Clasificación y etiología	32
1.2.1. Factores genéticos	33
1.2.2. Factores ambientales	33
1.3. Epidemiología	34
2. Privilegio inmune del sistema nervioso central	35
2.1. Barrera hematoencefálica y patogénesis de la esclerosis múltiple	37
3. Estrategias terapéuticas en esclerosis múltiple	39
3.1. Modelos de esclerosis múltiple en ratón	41
3.1.1. Modelos autoinmunes de EM	42
3.1.2. Modelos virales de EM	43
4. Cannabinoides	44
4.1. Historia	44
4.2. Sistema cannabinoide	47
4.2.1. Receptores cannabinoides y mecanismos de señalización celular	47
4.2.1.1. Receptor CB1: localización y funciones fisiológicas	48
4.2.1.2. Receptor CB2: localización y funciones fisiológicas	49
4.2.1.3. Otros receptores de cannabinoides	50
4.2.2. Endocannabinoides	51
4.2.2.1. Endocannabinoides: síntesis, recaptación y degradación	52
4.3. Compuestos cannabinoides	54
4.3.1. <i>Cannabis sativa</i> y los fitocannabinoides	54
4.3.2. Antagonistas de cannabinoides	56
4.3.3. Nuevos fitocannabinoides: Descripción de VCE-003, VCE-003.2, VCE-006 y VCE-004.8	57

4.4. Esclerosis múltiple y cannabinoides	58
4.4.1. Los cannabinoides como agentes neuroprotectores e inmunomoduladores ..	58
4.4.2. Aproximaciones terapéuticas con cannabinoides en EM	60
II. Objetivos	63
III. Métodos experimentales y material	67
1. Métodos experimentales	69
1.1. Modelos animales de esclerosis múltiple	69
1.1.1. Modelo de encefalomiелitis murina desmielinizante inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD)	69
1.1.1.1. Diseño experimental	69
1.1.1.2. Evaluación de la función motora (caja de actividad)	70
1.1.2. Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)	71
1.1.2.1. Diseño experimental	71
1.1.2.2. Seguimiento clínico de la EAE	72
1.2. Cultivos celulares	72
1.2.1. Cultivos primarios de neuronas	73
1.2.2. Cultivo primario mixto	73
1.2.2.1. Cultivo primario de microglía a partir de un cultivo mixto de encéfalo de rata	74
1.2.2.2. Cultivo primario de OPCs a partir de un cultivo mixto de encéfalo de rata	74
1.2.3. Cultivo de línea celular de células microgliales BV-2	75
1.2.4. Cultivo de línea celular de células endoteliales cerebrales murinas (bEnd5) ..	75
1.2.5. Cultivo de línea celular PC-12	75
1.2.6. Cultivo de las líneas celulares C6.9, HEK293, N2A, MO3.13, SK-N-SH, HT22 y PC-12	76
1.3. Determinación de la viabilidad celular	76
1.4. Transfección transitoria con plásmido reportero	76
1.5. Técnica de inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western blot).....	77
1.6. Enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA)	77
1.7. Determinación de nitritos	78
1.8. Estudios de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)	79
1.8.1. Extracción del ARNm	79

1.8.2. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	79
1.9. Análisis histopatológico	80
1.9.1. Procesado del tejido	80
1.9.2. Inmunohistoquímica	80
1.9.2.1. Marcaje con inmunofluorescencia	80
1.9.2.2. Marcaje con diaminobenzidina (DAB)	80
1.9.2.3. Marcaje de hematoxilina-eosina (H/E)	81
1.9.2.4. Marcaje de Nissl	81
1.9.2.5. Marcaje de Luxol Fast Blue (LFB)	81
1.9.2.6. Marcaje de mielina con el kit Hito CryoMyelinStain™	82
1.9.3. Evaluación de la infiltración celular	82
1.10. Microscopía óptica y confocal	83
1.10.1. Microscopía óptica y análisis de imagen	83
1.10.2. Microscopía confocal y análisis de imagen	83
1.11. Análisis estadístico	83
2. Material	85
2.1. Reactivos	85
2.1.1. Cultivos celulares	85
2.1.2. Procesamiento del tejido	86
2.1.3. Inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y otras tinciones	86
2.1.4. Marcadores	86
2.1.5. Determinación de la viabilidad celular	88
2.1.6. Inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western blot)	88
2.1.7. Extracción de ARN, transcripción inversa (RT), reacción en cadena de la polimerasa y transfecciones	89
2.1.8. Enzimoinmunoensayo en fase sólida (ELISA)	89
2.2. Compuestos	89
2.2.1. Compuestos utilizados en modelos de EM	89
2.2.2. Drogas y compuestos utilizados en los tratamientos	90
2.3. Instrumentos	90
IV. Resultados	93
1. Estudio del potencial terapéutico de nuevos derivados de cannabigerol: aproximación <i>in vitro</i> y con modelos de EM	95
1.1. Perfil antiinflamatorio del CBG y de su derivado VCE-003 <i>in vitro</i>	97
1.2. Estudio <i>in vitro</i> del perfil neuroprotector del CBG y de su derivado VCE-003	100

1.3. Activación <i>in vitro</i> de la vía antioxidante de Nrf2 tras el tratamiento con el compuesto VCE-003	101
1.4. Efecto del compuesto VCE-003 sobre células endoteliales <i>in vitro</i>	102
1.5. Efecto del CBG y VCE-003 sobre la maduración de oligodendrocitos <i>in vitro</i>	105
1.6. Papel antiinflamatorio y neuroprotector del compuesto VCE-003 en el modelo de EM de etiología viral, TMEV-IDD	106
1.7. VCE-003 reduce la actividad microglial y la expresión de moléculas de adhesión en el modelo de TMEV-IDD	108
1.8. VCE-003 atenúa la severidad clínica del modelo de etiología autoinmune de EM, EAE	109
1.9. El tratamiento con VCE-003 disminuye los infiltrados celulares, la reactividad microglial y la expresión de marcadores inflamatorios en médula espinal, en el modelo de EAE	111
1.10. VCE-003 reduce el daño axonal en animales inmunizados y preserva la estructura de la mielina en el modelo de EAE	113
1.11. Activación de la vía antioxidante de Nrf2 tras el tratamiento con el compuesto VCE-003 en el modelo de EAE	115
1.12. El compuesto VCE-003.2 atenúa la severidad clínica característica del modelo de EAE .	116
1.13. VCE-006 no reduce la severidad clínica del modelo de EAE	117
2. Estudio del potencial terapéutico de nuevos derivados de cannabidiol: aproximación <i>in vitro</i> y con modelos de EM	119
2.1. El compuesto VCE-004.8 reduce la muerte neuronal <i>in vitro</i> y disminuye la liberación de PGE ₂ en cultivos primarios de microglía	121
2.2. VCE-004.8 mejora el deterioro neurológico en el modelo de TMEV-IDD	122
2.3. VCE-004.8 reduce el deterioro neurológico en el modelo de EAE	125
V. Discusión	129
1. Eficacia terapéutica del derivado del fitocannabinoide cannabigerol, VCE-003	133
2. Eficacia terapéutica del derivado del fitocannabinoide cannabidiol, VCE-004.8	143
VI. Conclusiones	147
VII. Referencias	153
VIII. Anexos	191
Anexo 1	193
Anexo 2	205
Anexo 3	223
Anexo 4	239

RESUMEN

La esclerosis múltiple, la causa más común de discapacidad neurológica en adultos jóvenes, es una enfermedad autoinmune compleja con componente neuroinflamatorio, caracterizada por la infiltración de leucocitos en el sistema nervioso central, la desmielinización y el daño axonal. A pesar de ser la enfermedad desmielinizante más común del sistema nervioso central, aún no existe una terapia satisfactoria, especialmente en las formas de EM primaria-progresiva y durante la fase secundaria de la enfermedad. Por ello, existe una clara necesidad de investigación para el desarrollo de agentes terapéuticos capaces de disminuir el desarrollo de este trastorno progresivo.

Los fitocannabinoides son compuestos químicos presentes en la planta *Cannabis sativa*. Muchos de ellos no presentan efectos psicotrópicos, y se consideran de especial interés para el tratamiento de enfermedades del SNC. Entre estos fitocannabinoides sin efectos psicoactivos cabe destacar el cannabidiol y cannabigerol, entre otros. Su acción antiinflamatoria está medida por los receptores CB clásicos, y se ha demostrado que los receptores PPAR también pueden estar involucrados en estos efectos, presentando un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio. Se han desarrollado una serie de nuevos derivados de cannabigerol (VCE-003, VCE-003.2 y VCE-006) y de cannabidiol (VCE-004.8), cuyas modificaciones en su estructura química hacen que presenten mayor afinidad que los compuestos de origen por los receptores CB2 y PPAR γ , exhibiendo una actividad dual por los mismos.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que VCE-003 y VCE-004.8 son compuestos que reducen la muerte neuronal y ejercen efectos antiinflamatorios en cultivos celulares. Asimismo, actúan como agentes inmunomoduladores que activan los receptores CB2 y PPAR γ en dos modelos de esclerosis múltiple, tanto en la encefalomyelitis murina inducida por el virus de Theiler como en la encefalomyelitis autoinmune experimental. Además, estos compuestos reducen la infiltración de linfocitos T CD4 y disminuyen la activación microglial en la médula espinal. Ambos compuestos preservan la estructura de las vainas de mielina y contribuyen a la reducción del daño axonal. Su agonismo por los receptores CB2 y PPAR γ hace que se postulen como unos prometedores agentes antiinflamatorios y neuroprotectores para el posible tratamiento de la EM.

ABSTRACT

Multiple sclerosis, the most common cause of neurological disability in young adults, is a complex autoimmune disease characterized by neuroinflammation as reflected by the presence of leukocyte infiltrates into the central nervous system, the loss of myelin and the axonal damage in both the brain and the spinal cord. Despite its prevalence, no satisfactory therapy has been found for MS, particularly for the variants primary-progressive and the secondary phase. There is a clear need for the development of novel agents able to stop the development of this progressive disorder.

Non-psychotropic phytocannabinoids are considered of special interest as novel therapeutic agents in CNS diseases. These include cannabidiol and cannabigerol, among others. Besides their effects through the classical CB receptors, PPAR γ receptors have been shown to be involved the attenuation neuroinflammation by these compounds, showing a therapeutic potential for the treatment of inflammatory diseases. We have developed a series of new cannabigerol (VCE-003, VCE-003.2 and VCE-006) and cannabidiol derivatives (VCE-004.8) that show CB2 and PPAR γ receptors affinity.

The findings of this doctoral thesis show that VCE-003 and VCE-004.8 are compounds that reduce neuronal death and exert anti-inflammatory effects in cell cultures. Moreover, these compounds act as immunomodulatory agents targeting CB2 and PPAR γ receptors in two models of multiple sclerosis, Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease and experimental autoimmune encephalomyelitis. Furthermore, these compounds reduce CD4 T cells infiltrates and diminish microglial activation, preserve myelin sheets structure and reduce axonal damage in the spinal cord. Their dual affinity for CB2 and PPAR γ receptors is critical for their consideration as a novel anti-inflammatory and neuroprotective compounds for the treatment of several inflammatory diseases, such as multiple sclerosis.

I. Introducción

1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1.1. Definición y sintomatología

La esclerosis múltiple (EM), descrita por Charcot en 1868, se considera la enfermedad crónica inflamatoria desmielinizante y neurodegenerativa más común del sistema nervioso central (SNC), y es la principal causa de discapacidad neurológica en adultos jóvenes tras los accidentes de tráfico. Además de desmielinización, esta enfermedad se caracteriza por la pérdida axonal que es la causa del deterioro irreversible en fases avanzadas de la enfermedad (Noseworthy, 1999; Dutta y Trapp, 2011). La sintomatología es muy variada, ya que depende de la zona del SNC afectada, pero es frecuente que los pacientes comiencen con problemas en el habla y en la visión, dificultad en los movimientos, fatiga, temblor, nistagmo, pérdida de coordinación o equilibrio, entumecimiento o insensibilidad, y ya en fases avanzadas de la enfermedad cursen con parálisis aguda y deterioro cognitivo.

Aunque la EM puede afectar a individuos de todas las edades, la mayoría de los pacientes desarrollan los primeros síntomas entre los 20 y 40 años. Habitualmente, la EM comienza como un proceso recurrente-remitente, caracterizado por la presencia de discapacidad neurológica reversible parcial o totalmente. Secundariamente, tras un periodo de tiempo largo pero variable de brotes y remisiones, evoluciona a un estado progresivo de deterioro en el que se acumula la discapacidad. La EM se caracteriza por la presencia de focos inflamatorios predominantemente en áreas de sustancia blanca del SNC, seguidos de la destrucción de la mielina en el cerebro y la médula espinal (Frohman y cols., 2006). Además de la desmielinización se puede producir daño axonal, tanto en las placas de desmielinización como en las zonas de sustancia blanca aparentemente normal. Los patrones de desmielinización son diferentes entre subgrupos de pacientes, lo que indica que es una patología altamente heterogénea.

Se sabe que la enfermedad comienza mucho antes que el inicio de los síntomas, y cuando éstos aparecen, ya hay ciertas evidencias de alteraciones en cerebro y médula espinal. Tanto los síntomas, como la severidad y el curso de la enfermedad dependen del lugar donde se formen las placas de desmielinización y el grado de desmielinización y neurodegeneración que exista. Hay aparición de infiltrados inflamatorios en áreas perivasculares y periventriculares, posiblemente debido a cambios en la barrera hematoencefálica (BHE), y si bien el componente celular más estudiado ha sido la población de infiltrados inflamatorios de linfocitos T CD4⁺, se considera que hay predominancia de linfocitos T CD8⁺ en las lesiones desmielinizantes (Hauser y cols., 1986). Durante años, los linfocitos B se han considerado una fuente de precursores de células plasmáticas, las encargadas de liberar anticuerpos, pero cada vez cobran más importancia en EM,

modulando las vías anti- o proinflamatorias del sistema inmune (Li y cols., 2015; Waisman y Korn, 2015). De hecho, algunos tratamientos actuales de EM consisten en la depleción de los linfocitos B mediante el anticuerpo anti-CD20 (Hauser y cols., 2008), como el rituximab, que disminuye las lesiones inflamatorias y los brotes. Así se puso de manifiesto la importancia de la respuesta humoral en EM, con la demostración de que más del 95% de los pacientes muestran síntesis intratecal de inmunoglobulinas (Ig) y presentan bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo.

1.2. Clasificación y etiología

Actualmente se desconoce la etiología de la EM, si bien se acepta que el inicio se produce como consecuencia de interacción de factores ambientales y factores genéticos. Su nombre procede de la presencia de múltiples zonas escleróticas desmielinizadas (placas) dispersas, pero preferentemente en zonas periventriculares del SNC, que se producen irregularmente en el tiempo. La EM se puede categorizar clínicamente como remitente-recurrente (EM-RR), que se caracteriza por la aparición de brotes con recuperación completa o secuela sin progresión en los periodos entre brotes; secundaria-progresiva (EM-SP), que se caracteriza por un curso inicial remitente-recurrente seguido por una progresión con o sin brotes; y primaria-progresiva (EM-PP), caracterizada por progresión desde el inicio con periodos de estabilidad clínica (Figura 1).

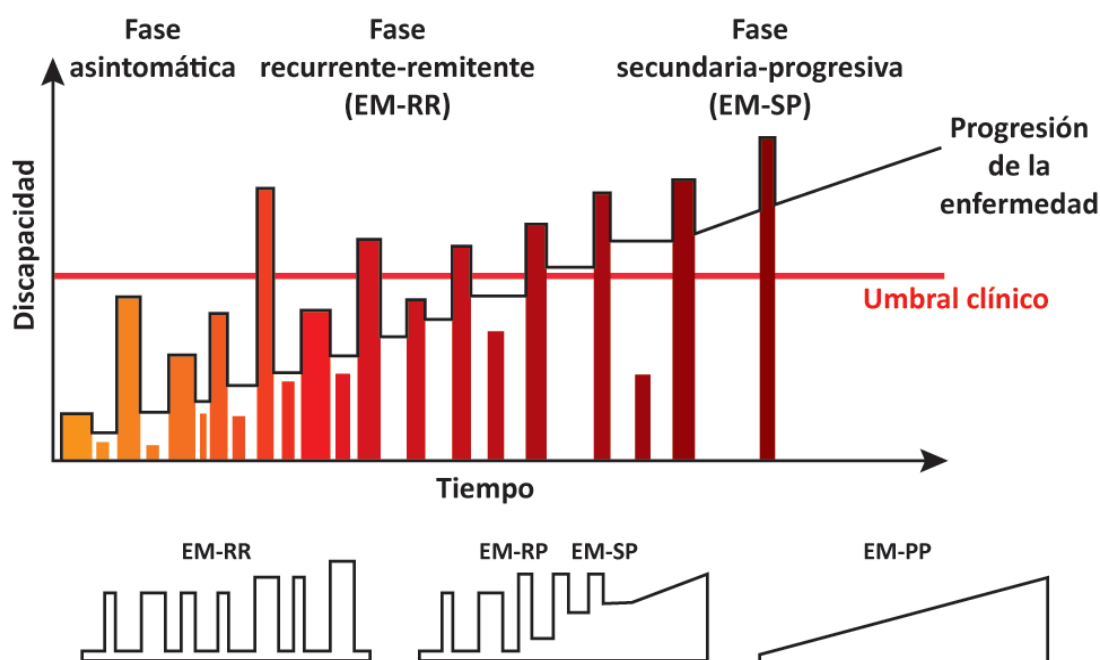


Figura 1. Evolución del deterioro neurológico en EM en función del tiempo y clasificación de los diferentes subtipos de la enfermedad. EM: Esclerosis múltiple; RR: Remitente-recurrente; RP: Remitente-progresiva; SP: Secundaria-progresiva; PP: Primaria-progresiva.

1.2.1. Factores genéticos

Diversos estudios confirman la existencia de factores genéticos que predisponen a padecer la enfermedad. Alrededor del 15% de los pacientes tienen un familiar en primer grado afectado, normalmente un hermano, aunque los estudios realizados comparando frecuencias en gemelos monocigóticos y gemelos dicigóticos (25,3% frente a 5,4%) (Willer y cols., 2003) sugieren que la EM es una enfermedad multigénica (Compston, 1994). Desde hace unos años se asocia un incremento de la susceptibilidad a cursar la enfermedad con la posesión de ciertos alelos de riesgo, sobre todo los relacionados con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major histocompatibility complex*), tanto de clase I como II, aunque estos últimos son los más involucrados, y mayormente los alelos del gen *DRB1* (Sawcer y cols., 2011).

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *Genome-Wide Association Study*) han resultado ser una herramienta útil en el descubrimiento de variantes que influyen en la susceptibilidad genética de EM. En la actualidad, se han asociado con la susceptibilidad cerca de 110 polimorfismos en 103 loci externos al MHC (Sawcer y cols., 2014; Hollenbach y Oksenberg, 2015), principalmente relacionados en la respuesta inmunitaria y con las vías de señalización de citoquinas, incluyendo los genes de interleuquina (IL)-2, factor de necrosis tumoral α (TNF α), e IL-6 (Sawcer y cols., 2011). Estos datos muestran que puede haber una atribución de varios genes en la susceptibilidad a padecer EM. A resaltar es la asociación de EM con una variante del gen *CYP27B1*, que codifica para una encima que participa en el metabolismo de la vitamina D, ya que se han descrito bajos niveles de vitamina D en pacientes de EM (James y cols., 2013).

También se deben tener en cuenta factores epigenéticos, como los micro-ARNs (ARNmi), pequeñas moléculas de ARN no codificante que regulan la expresión de ARNm, la metilación de ADN (Van den Elsen y cols., 2014) o la modificación postransduccional de las histonas de los nucleosomas (Zhang y Zhang, 2015).

1.2.2. Factores ambientales

Ya que los datos referentes a los factores genéticos no explican totalmente la susceptibilidad a padecer EM, deben existir factores ambientales de riesgo que influyan como desencadenantes de la patología. Dentro de estos factores se han desarrollado varias hipótesis, como la exposición al sol, variación en los niveles de vitamina D, vitamina E, vitamina A, procesos infecciosos con virus en una ventana de edad concreta (consultar la revisión de Ontaneda y cols., 2012), el tabaquismo, o más recientemente, la ingesta de sal (Farez y cols., 2015).

Como veremos en el apartado 1.3, dependiendo de la latitud geográfica aumenta la fre-

cuencia de la EM, de tal manera que cuanto más nos alejemos del ecuador, más susceptibilidad existe. Algunos estudios relacionan bajos niveles de vitamina D, comunes en pacientes de EM, con los niveles de radiación UV, aunque Lucas y cols. (2011) los consideran factores de riesgo independientes. Se ha observado que la administración de vitamina D previene el desarrollo de la patología en el modelo autoinmune de EM conocido como encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Lemire y Archer, 1991), y otros estudios consideran que los pacientes toleran correctamente altas dosis de vitamina D, pero no existe una mejora significativa en humanos respecto al descenso en el número de recaídas (James y cols., 2013).

Teniendo en cuenta los datos epidemiológicos, otra hipótesis que se considera es la de que un agente infeccioso podría estar relacionado con la EM, ya que aunque la prevalencia es variable en los distintos países, se han descrito focos y epidemias que coinciden con aumentos en la prevalencia de la enfermedad (Kurtzke, 1993). Se han considerado diferentes virus como posibles agentes etiopatogénicos, entre los que destacan el herpes simple 6 humano (HHV-6), el virus del sarampión, de la varicela y el virus del moquillo canino, y según los últimos estudios el virus de Epstein-Barr (VEB). La mononucleosis y la EM presentan una distribución geográfica similar, y existen estudios que demuestran una prevalencia de la EM diez veces mayor en pacientes que antes han desarrollado mononucleosis en la niñez (Ascherio y Munger, 2007).

En los últimos años también se ha relacionado a los retrovirus endógenos humanos (HERVs, del inglés *Human endogenous retroviruses*) con diferentes enfermedades, y se han encontrado proteínas, ARN o viriones en diferentes tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y especialmente EM (Perron y cols., 2012; García-Montojo y cols., 2014).

1.3. Epidemiología

La EM muestra características que hacen difícil el diseño y desarrollo de estudios epidemiológicos, ya que tiene periodos de latencia y de inducción muy prolongados. Los primeros estudios de prevalencia realizados por Kurtzke (1980) mostraron una distribución irregular de la enfermedad en todo el mundo, aunque se aprecia una mayor frecuencia entre los 40° y 60° de latitud norte y sur (Figura 2). Actualmente, se ha apreciado un aumento muy llamativo de las tasas de prevalencia. Por ejemplo, en Europa se han descrito tasas de prevalencia elevadas en países escandinavos y Reino Unido, lo mismo que otros países de esa latitud (EEUU y Canadá), mientras que en África, Asia o países sudamericanos la prevalencia de la EM es muy baja, aunque hay que tener en cuenta el escaso número de estudios en estos países. Se ha estimado que en España la frecuencia es de 100 personas por cada 100.000 (año 2013), un dato muy superior a las 59 personas registradas por cada 100.000 en el año 2008 (Kingwell y cols., 2013).

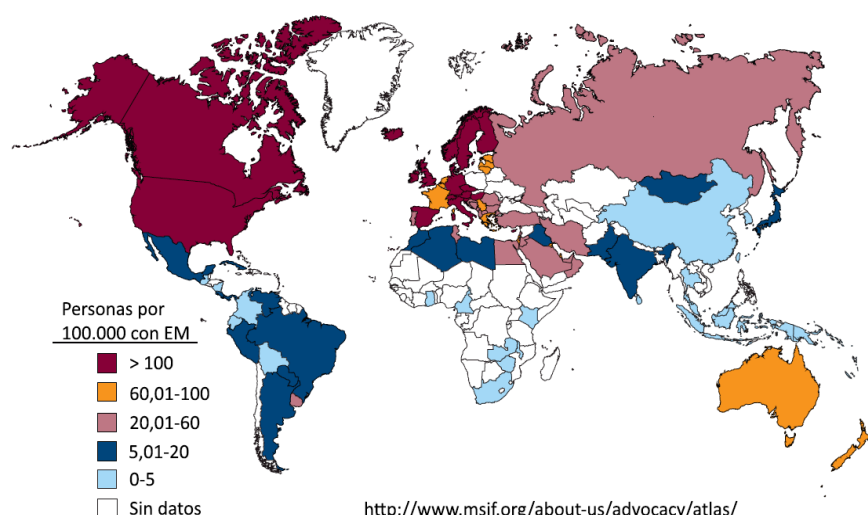


Figura 2. Prevalencia de la EM en el mundo (2013). Modificado de la página web de la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple: <http://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/>.

Hay estudios sobre emigración que describen un periodo susceptible entre los 10 y los 15 años (Fernández y Fernández, 1998), con un periodo mínimo de 2 años de estancia en los países con una mayor tasa de prevalencia (Fernández y Rodríguez-Antigüedad, 2010).

Algunos expertos han intentado explicar la elevada incidencia de la EM con la hipótesis de la higiene, en la que se expone que está aumentando la prevalencia de las enfermedades autoinmunes en sentido inverso al descenso de las infecciones durante la infancia (Rook, 2012).

2. PRIVILEGIO INMUNE DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El SNC es, en muchos aspectos, un área con privilegios inmunológicos. Esto quiere decir que el paso de determinadas moléculas de gran tamaño y células desde la circulación periférica es muy selectivo, y que en situaciones basales y no patológicas el tráfico de estas moléculas es relativamente bajo o inexistente (Wilson y cols., 2010; Engelhardt y Coisne, 2011), comparado con otros órganos. El concepto de privilegio inmune viene dado por la aparente diferencia entre las respuestas inmunes en SNC y en tejidos periféricos.

Este privilegio inmune es consecuencia principalmente de la existencia de la BHE, un entramado complejo que forma una barrera celular continua entre el SNC y la circulación sistémica, una lámina basal y pies astrocitarios, astrocitos, las neuronas y sus axones, y otras células de apoyo, como los pericitos (Engelhardt y Coisne, 2011; Muldoon y cols., 2013). Se ha considerado que es la estructura responsable de proveer al SNC de nutrientes, oxígeno, vitaminas, iones y cofactores como péptidos y proteínas, y limita la entrada al SNC de metabolitos tóxicos, macrófagos perivasculares, células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*), células presentadoras de antígeno (APCs,

del inglés *Antigen presenting cells*) y xenobióticos. La BHE también ejerce una importante función en el sentido contrario, desechando el dióxido de carbono y otros metabolitos potencialmente tóxicos generados por el SNC.

Las características del privilegio inmune del SNC son las siguientes:

- Entrada limitada de anticuerpos, mediadores y células inmunes a través de la BHE, procedentes de la circulación sistémica.
- Ausencia de vasos linfáticos en el parénquima nervioso, que drenen antígenos y células inmunes del SNC a nódulos linfáticos periféricos, aunque trabajos recientes demuestran la existencia de vasos linfáticos inmersos en la duramadre, que estaría en íntima conexión con el líquido cefalorraquídeo y en contacto con antígenos del SNC (Louveau y cols., 2015).
- La incapacidad de astrocitos y microglía para mantener en el tiempo una respuesta inmune.
- La escasez de DCs en el parénquima nervioso, niveles bajos en la expresión del MHC y respuestas inmunes tardías o reducidas en el cerebro.

Existen sustancias altamente lipofílicas capaces de entrar en el SNC directamente a través de membranas, pero la mayoría de los nutrientes cruzan la barrera mediante difusión facilitada, normalmente por mecanismos que acoplan el movimiento de los nutrientes con el movimiento de iones que se mueven hacia un gradiente de concentración menor (Perez y cols., 1988; Zlokovic, 2011).

En condiciones basales, los linfocitos son capaces de realizar una “vigilancia” de bajo nivel por todo el SNC, y su entrada limitada está regulada por una barrera vascular, además de la expresión restringida de moléculas de adhesión celular (CAMs, del inglés *cell adhesion molecules*) endoteliales, que son necesarias para capturar a los linfocitos del torrente sanguíneo. El nivel de la vigilancia inmune es una mínima parte de lo observado en otros tejidos (Raine y cols., 1990; Carrithers y cols., 2000), y en situaciones no patológicas el tráfico estimado entre el SNC y los vasos sanguíneos es 100 veces menor que en otros órganos, como por ejemplo, en bazo y pulmón (Hickey y cols., 1991; Hickey, 1999). La extravasación de linfocitos activados está mediada por la acción conjunta de receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos, que conllevan cambios morfológicos para leucocitos y células endoteliales (Barreiro y cols., 2007; Barreiro y Sánchez-Madrid, 2009).

2.1. Barrera hematoencefálica y patogénesis de la esclerosis múltiple

Uno de los posibles desencadenantes de la EM podría ser un proceso inflamatorio que comenzaría con la activación de linfocitos T en tejidos periféricos, en el que APCs presentarían antígenos extraños o antígenos propios al complejo MHC II y se unirían a los receptores de células T (TRC, del inglés *T-cell receptors*). Estos linfocitos T activados migrarían y se introducirían en el parénquima nervioso a través de la BHE, predominantemente en zonas periventriculares, en un proceso mediado por CAMs, proteasas y quimioquinas. Ya en el SNC, los linfocitos T serían reactivados por APCs del SNC, generalmente microglía, y liberarían citoquinas proinflamatorias, como interferón (IFN) γ e ILs, generando un ambiente inflamatorio (Figura 3). Como consecuencia, también se activarían linfocitos B, macrófagos y otros linfocitos T. Los linfocitos B se diferenciarían a células plasmáticas, que secretarían anticuerpos específicos de proteínas de mielina, activando macrófagos e iniciando la respuesta del complemento. Toda esta respuesta, junto con la activación de linfocitos T y macrófagos, y la liberación de agentes citotóxicos, generarían un ataque contra las membranas celulares, produciendo desmielinización y daño axonal.

En pacientes de EM se han encontrado linfocitos T autorreactivos contra antígenos específicos de mielina en sangre periférica, habiéndose postulado la existencia de mecanismos que pueden generar autoinmunidad, entre los que se encuentran el mimetismo molecular, que implica la reactividad cruzada entre epítomos de antígenos no propios, bacterianos o virales (Fujinami y

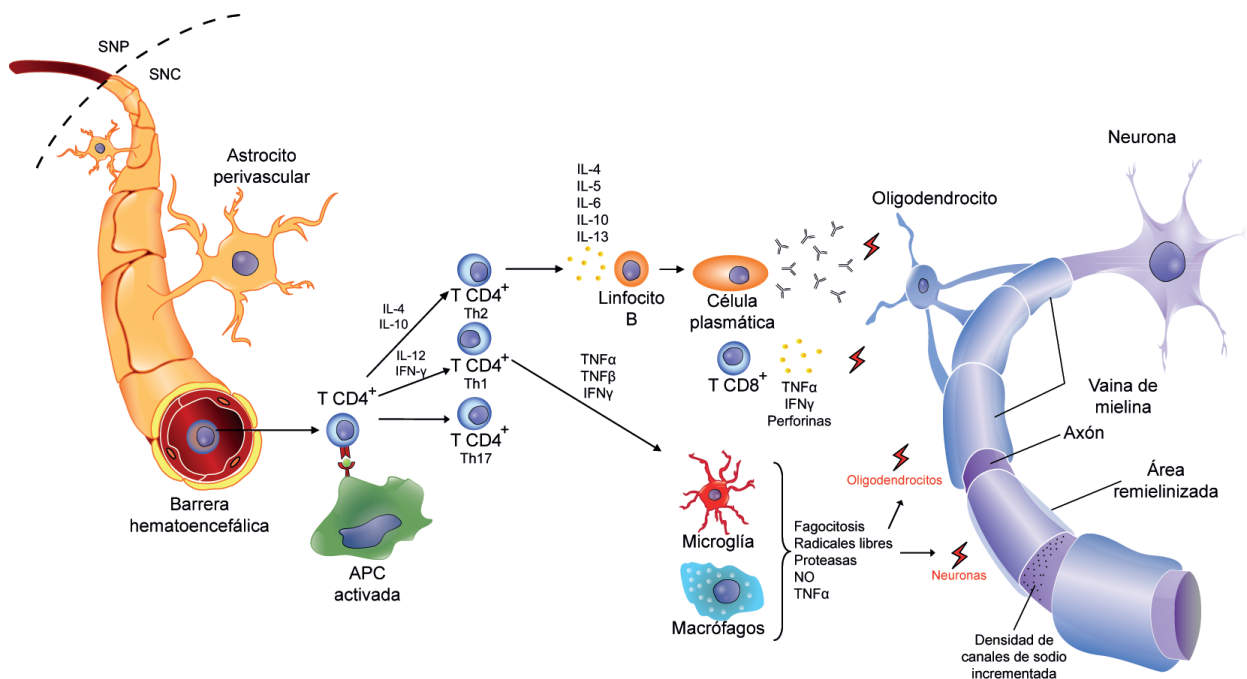


Figura 3. Hipótesis del inicio de la inflamación en EM. Se piensa que el proceso comienza con la activación de linfocitos T en tejidos periféricos, que posteriormente migran a través de la barrera hematoencefálica y se reactivan en el parénquima del SNC. Esto conllevaría la activación de células del sistema inmune, que participarían en el daño a neuronas y oligodendrocitos, induciendo desmielinización y daño axonal.

Oldston, 1985); expansión de epítomos, que implica la activación de los linfocitos T autorreactivos frente a secuencias similares de epítomos de mielina propios (Miller y Karpus, 1994), tras el daño en el tejido como consecuencia de la respuesta inmune; y los superantígenos virales, que conlleva la activación no específica de linfocitos T autorreactivos por moléculas inmunoestimuladoras producidas por virus y bacterias, pero que no se unen al complejo formado por el receptor del linfocito T, el antígeno y MHC II (Scherer y cols., 1993).

Hasta hace unos años se desconocían los mecanismos por los que se presentan antígenos desde el SNC a la periferia, y aunque el SNC carece de un sistema linfático como tal, hay estudios que demuestran la aparición de antígenos del SNC en nódulos linfáticos cervicales (De Vos y cols., 2002), posiblemente debido al contacto entre el líquido cefalorraquídeo y la placa cribiforme, y ésta con el torrente sanguíneo.

En condiciones de neuroinflamación, como es el caso de la EM, existe una desregulación de las uniones adherentes y uniones estrechas asociada a una pérdida del control de la permeabilidad de la BHE, incrementándose el número de infiltrados celulares y de compuestos que en situaciones no patológicas no llegarían al SNC (Persidsky y cols., 2006).

Como se ha comentado, el paso de células inmunes al SNC está limitado pero no prohibido. La extravasación de los leucocitos es un proceso importante en la respuesta inflamatoria en SNC, y podemos dividirlo en varias etapas. La primera consiste la fase de rodamiento, en la que el leucocito establece contactos de mayor y menor afinidad con selectinas hasta detenerse (Wilson y cols., 2010), y se adhiere de forma lábil al endotelio vascular gracias a receptores de adhesión celular y moléculas quimioatrayentes. A continuación, se produce una adhesión firme y empieza la migración transendotelial (Hernández-Pedro y cols., 2013). Algunos ejemplos de moléculas implicadas en este tipo de migración son las moléculas de adhesión endoteliales (VCAMs) y moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), que se expresan mayoritariamente en células endoteliales, y la integrina $\alpha 4$ (VLA-4, del inglés *Very late antigen 4*), y LFA-4 (del inglés *Leukocyte functional antigen-4*), expresadas en linfocitos T. Las quimioquinas potencian la afinidad de la unión de los complejos ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/VLA-4. La interacción de los linfocitos cooperadores 1 (T_H , del inglés *Helper*) y las APCs, normalmente macrófagos perivascuales, provoca la liberación de citoquinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios, provocando cambios estructurales en la BHE. La última etapa consistiría en la diapédesis y entrada del leucocito al parénquima nervioso (Greenwood y cols., 2011). De esta manera se refuerza y persiste la respuesta inflamatoria (Ricci y cols., 2009).

También pueden darse alteraciones en otro componente de la BHE, la lámina basal, debido a cambios en la expresión de ciertas metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés *Matrix metallo-*

proteinasas). Esto, junto con cambios en la expresión de distintas lamininas, pueden ayudar a que se formen áreas de infiltración de linfocitos T (Sixt y cols., 2001).

Por otro lado, en la patogénesis de la EM participan metabolitos de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*) y de nitrógeno, que provocan estrés oxidativo (Halliwell, 1992; Korhonen y cols., 2005). De hecho, se han encontrado niveles significativamente más elevados de metabolitos de óxido nítrico y productos de peroxidación de lípidos en suero de pacientes con EM (Ortiz y cols., 2009), además de una sobreexpresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *inducible Nitric oxide synthase*) en lesiones de EM y líquido cefalorraquídeo de pacientes (Calabrese y cols., 2002), y se han relacionado los altos niveles de metabolitos de óxido nítrico con las recaídas en EM, sugiriendo un papel importante en la disfunción de la BHE (Giovannoni y cols., 1998). Además, los infiltrados leucocitarios producen mayores cantidades de ROS, que contribuyen al daño oligodendroglial y daño axonal. El glutamato, un neurotransmisor implicado en diversas funciones celulares en el SNC, también puede provocar excitotoxicidad si se ve incrementada la concentración extracelular, como se aprecia en pacientes con EM (Pitt y cols., 2000; Groom y cols., 2003).

3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Actualmente, la técnica más extendida para el diagnóstico de la EM es la imagen por resonancia magnética (MRI, del inglés *Magnetic resonance imaging*), aunque existe controversia sobre la efectividad de esta técnica para la prognosis. Hay evidencias de que una o varias lesiones analizadas por MRI que presentan mayor señal de gadolinio en el primer año de tratamiento con IFN β predicen una mayor probabilidad de padecer más de dos recaídas en los próximos cinco años, pero no predice un aumento en la probabilidad de acumular discapacidad en los dos años siguientes (Dobson y cols., 2014); y a partir del primer año, parece que el escáner por MRI es menos predictivo. Otro procedimiento que se utiliza para ayudar en la diagnosis de la EM es la punción lumbar como

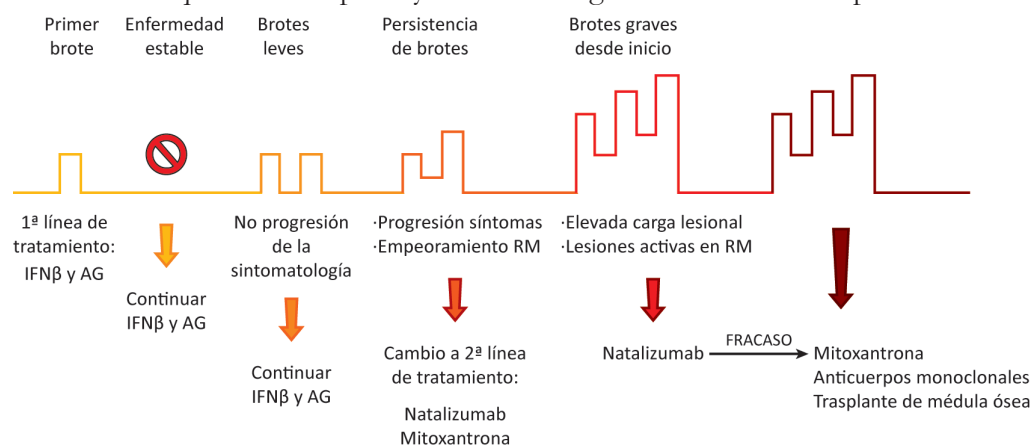


Figura 4. Procedimiento estándar para el tratamiento de las distintas variantes de la EM.

AG: acetato de glatirámero; IFN β : interferón β .

método para extraer líquido cefalorraquídeo y analizar diferentes parámetros, como las bandas oligoclonales, aunque hay que tener en cuenta que la actividad de los biomarcadores no siempre transcurre en paralelo con los brotes en EM (Teunissen y Khalil, 2012; Housley y cols., 2015), si bien las bandas oligoclonales de IgMs se consideran marcadores de una peor progresión de la enfermedad en la variante de EM-PP (Villar y cols., 2002; 2014). Otros biomarcadores utilizados en la diagnosis de la EM son las bandas oligoclonales de IgG y la cadena ligera del neurofilamento en líquido cefalorraquídeo, así como la cadena ligera del neurofilamento y los miARN 20a-5p, 22-5p, 223 y 15b en sangre (para más información sobre los biomarcadores, consultar la revisión de Teunissen y cols., 2015).

El tratamiento de la EM varía dependiendo de las características individuales de la enfermedad. Existen diferentes tratamientos aprobados para reducir la frecuencia de brotes y discapacidad en pacientes con EM (Figura 4). Los fármacos de primera línea más utilizados incluyen el IFN β -1b subcutáneo (Betaferón®), IFN β -1a intramuscular (Avonex®), IFN β -1a subcutáneo (Rebif®) y acetato de glatirámico (AG, Copaxone®). Como fármacos de segunda línea se utilizan el anticuerpo monoclonal humanizado natalizumab (Tysabri®) y el antineoplásico mitoxantrona (Novantrone®).

Uno de los problemas sobre los estudios de efectividad del tratamiento de la EM con IFNs son los estudios a largo plazo, que tienen muchas limitaciones, como los datos retrospectivos, regímenes abiertos y elevado número de pacientes que abandonan el estudio, por lo que no se ha demostrado que exista un beneficio mantenido más allá de dos años (Filippini y cols., 2003). Otro inconveniente son los efectos secundarios, como los síntomas pseudogripales, trastorno hepático, necrosis cutánea, anemia, etc., muy variables dependiendo del paciente. En ocasiones aparecen anticuerpos neutralizantes que pueden afectar a la eficacia clínica de los IFNs.

La mayoría de las terapias actuales para EM tienen efectos antiinflamatorios, inmunosupresores y/o inmunomoduladores. Un ejemplo es el natalizumab (Tysabri®), un anticuerpo humanizado que bloquea la integrina VLA-4 de los linfocitos, ligando de VCAM-1, lo que provoca que los linfocitos no se acoplen a VCAM-1 y así se evita la migración dentro del parénquima nervioso. A pesar de la eficacia del natalizumab para mejorar los síntomas de la EM, se ha observado que su uso puede provocar infecciones virales en el SNC como la leucoencefalopatía multifocal progresiva, una enfermedad infecciosa oportunista y desmielinizante producida por el virus John Cunningham (Koralnik, 2006; Álvarez y cols., 2011). La vía de administración de los tratamientos también es un problema a solventar, ya que los fármacos más utilizados son administrados por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, aunque con la investigación de nuevos tratamientos se ha conseguido que en los últimos años se comercialicen nuevos fármacos cuya ruta de administración es la oral (Figura 5), como por ejemplo el fingolimod (Gilenya®), teriflunomida (Aubagio®), y el dimetil fumarato (DMF; Tecfidera®).

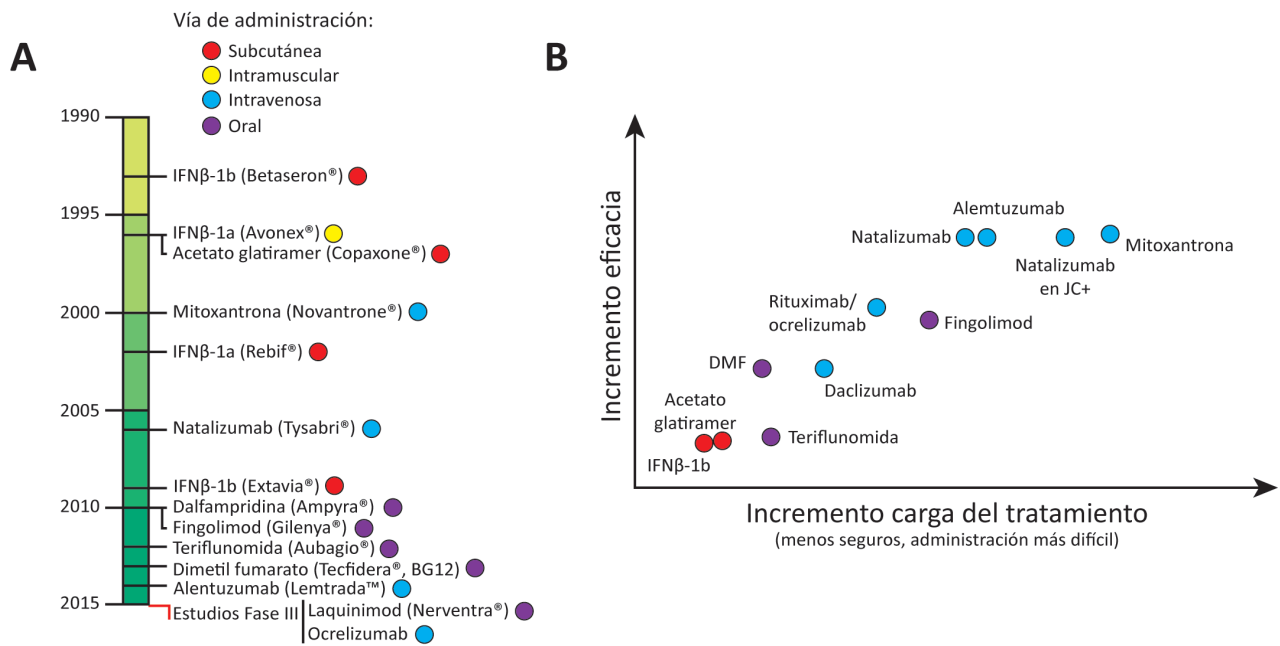


Figura 5. Tratamientos actuales para pacientes de EM y vía de administración (A). Gráfica sobre el incremento de eficacia de los tratamientos y riesgo de los mismos (B), modificado de Coles (2015).

Especial relevancia está teniendo el ocrelizumab (Roche), un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20, del que se han presentado resultados muy prometedores de un estudio en fase III en el congreso del Comité Europeo para el Tratamiento y la Investigación en Esclerosis Múltiple (ECTRIMS) de 2015. Este fármaco ha reducido hasta un 24% la progresión de la enfermedad en relación al grupo placebo, y podría resultar efectivo como tratamiento para la EM-RR y EM-PP.

3.1. Modelos de esclerosis múltiple en ratón

El uso de modelos animales para estudiar enfermedades de etiología desconocida o multifactorial es complicado, por lo que se emplean modelos que reproduzcan la mayor parte de los síntomas, y en la mayoría de los casos es necesario utilizar más de un modelo animal para investigar la patología.

Dependiendo de la etiología, los modelos animales utilizados para estudiar la EM se clasifican en dos grupos, autoinmunes y virales. Estos modelos reproducen la mayor parte de la fisiopatología de la EM, como la presencia de infiltrados celulares en parénquima nervioso, alteraciones en la BHE, desmielinización y daño axonal. Además, dichos modelos han permitido estudiar los mecanismos inflamatorios implicados en la patofisiología de la EM (Moreno y cols., 2012). Existen otros modelos de desmielinización inducida por estímulos gliotóxicos, como la cuprizona y lisolecitina, que comparten alguna de las características de la EM, pero no son comparables a los modelos experimentales de EM.

3.1.1. Modelos autoinmunes de EM

La EAE es un modelo bien establecido para estudiar la EM. La inmunización de los animales puede ser activa, en la que se inyecta un homogeneizado de SNC o de mielina, componentes de la mielina o péptidos sintéticos relacionados (glicoproteína oligodendrocitaria de mielina, MOG; proteína básica de mielina, MBP; o proteína proteolipídica de mielina, PLP), combinado con adyuvante completo de Freund, y en algunos casos, también se administra *Bordetella pertussis* para permeabilizar la BHE. También se puede utilizar la inmunización pasiva, en la que se inyectan células T encefalitogénicas específicas de antígenos del SNC generadas en otro animal. Después de unos días aparecen los primeros signos clínicos, que resultan en una parálisis ascendente, que afecta a la cola y progresa hacia las extremidades anteriores. Con este modelo se induce una enfermedad desmielinizante inflamatoria y autoinmune, que puede ser tanto progresiva como remitente-recurrente, dependiendo de la proteína con la que se inmunice y la cepa animal. Existen variantes dentro del modelo de EAE, como son el modelo agudo, el recurrente-remitente y el crónico-progresivo (Steinman y Zamvil, 2006).

También existen modelos espontáneos de EAE, que no requieren la inducción de la patología para que desarrollen signos clínicos. Consisten fundamentalmente en la manipulación genética de los animales para conseguir la expresión de receptores de linfocitos T específicos para un antígeno concreto, aunque su uso no está muy extendido por la heterogeneidad y baja incidencia.

Koritschoner y Schweinburg en 1925 indujeron la EAE por primera vez en conejos, inoculando homogeneizados de médula espinal humana, y el uso de esta técnica se ha expandido a otras especies, como ratones, ratas, cobayas y monos (Gold y cols., 2006). Como se ha comentado anteriormente, el modelo de EAE está mediado en primera instancia por linfocitos T CD4⁺ específicos para los antígenos del SNC. Durante la fase de inducción, dichos linfocitos T CD4⁺ activos proliferan en periferia y se infiltran en el SNC interaccionando con células endoteliales, que facilitan su paso a través de la BHE. Una vez en el parénquima nervioso, estos linfocitos autorreactivos son reactivados por APCs, como la microglía, DCs o macrófagos perivasculares, desencadenando la fase efectora, acompañados de infiltrados mononucleares, además de la liberación de mediadores proinflamatorios (Tsunoda y Fujinami, 1996; Nelson y cols., 2004; Constantinescu y cols., 2005). La patología que se induce está caracterizada por la muerte de oligodendrocitos, desmielinización y degeneración axonal, que conduce a deficiencias neurológicas, dificultades en el movimiento y parálisis (Gold y cols., 2006; Steinman y Zamvil, 2006).

Aunque la EAE no refleja todas las características de la EM, existen algunas terapias para EM que han llegado a aplicarse en base a sus efectos en este modelo experimental, como es el caso del AG (Teitelbaum y cols., 1971), IFN β (Hertz y Deghenghi, 1985), mitoxantrona (Lublin y cols., 1987) y natalizumab (Yednock y cols., 1992).

3.1.2. Modelos virales de EM

Los modelos que apoyan la etiología viral de la EM implican la inoculación de un virus neurotrópico, como los enterovirus o coronavirus, que induce una patología desmielinizante en los animales. Las hipótesis que se barajan principalmente de la inducción de autoinmunidad por las infecciones son: i) la liberación de antígenos propios al dañarse un tejido durante una respuesta inflamatoria contra el virus, un mecanismo inespecífico por el que se activan los linfocitos T autorreactivos mediante superantígenos virales, explicados anteriormente; ii) la expansión de epítomos, consecuencia del proceso anterior, en la que la respuesta antiviral daña el tejido durante una inflamación crónica, liberando epítomos propios que son captados por APCs y presentados a linfocitos T, resultando en una activación de linfocitos T autorreactivos; y iii) el mimetismo molecular, el mecanismo principal que se propone para la inducción de autoinmunidad por virus, que consiste en una reactividad cruzada entre epítomos propios y epítomos de un patógeno.

El modelo viral de EM más utilizado es el de la encefalomiелitis murina desmielinizante inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD, del inglés *Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced disease*), que reproduce la patología de la variante primaria progresiva (Lipton, 1975).

El virus de Theiler es un picornavirus (género Cardiovirus) patógeno entérico de ratón, formado por una única cadena de ARN de polaridad positiva, que fue aislado del SNC de ratones con parálisis espontánea de las patas traseras en 1934 por Max Theiler. Aunque en los años 50 Daniels y cols. observaron que los ratones infectados con el virus de Theiler sufrían desmielinización (Daniels y cols., 1952), no fue hasta 1975 cuando se publicó que el virus inducía una patología inflamatoria y desmielinizante en animales de experimentación (Lipton, 1975), y se le empezó a considerar como un modelo animal de EM. El virus de Theiler se subdivide en dos grupos en función de su virulencia, las cepas extremadamente virulentas o GDVII, y las menos virulentas, que incluyen las que son utilizadas para inducir el modelo de EM, las cepas BeAn y Daniel (DA), que presentan una evolución diferente de la enfermedad (Oleszak y cols., 2004). Para el desarrollo del modelo, es necesaria la utilización de cepas de ratones susceptibles, como SJL/J, FVB/NJ y ABH Biozzi, que también presentan un componente ligado al sexo, siendo las hembras las más afectadas (Kappel y cols., 1990).

El modelo consiste en la inducción de una enfermedad bifásica a través de la administración intracraneal del virus de Theiler: en la primera fase, tiene lugar una polioencefalomiелitis, aproximadamente a los 10-15 días post-infección (dpi), en la que el virus se localiza principalmente en neuronas. Sin embargo, esta fase puede evitarse atenuando la virulencia del virus, tras someterle a sucesivos pases en cultivo de células BHK-21. Pocas semanas después tiene lugar la segunda fase, aproximadamente a los 30-40 dpi (cepa BeAn) o 70-90 dpi (cepa DA), en la que los ratones de cepas susceptibles que no han eliminado totalmente el virus, como la cepa SJL/J, sufren una desmieli-

nización acompañada de inflamación en el SNC (Dal Canto y Lipton, 1975; 1977; Mecha y cols., 2013a). En el caso del modelo TMEV-IDD, los animales sólo son susceptibles a desarrollar la enfermedad si se inocula el virus en una ventana temporal, que se encuentra entre las 4-8 semanas de edad (Rodríguez y cols., 1983) y es necesario que el animal no elimine el virus para que se desarrolle la patología (Dal Canto y Lipton, 1977).

Entre los trastornos neurológicos que se pueden ocasionar en los ratones que desarrollan TMEV-IDD, las alteraciones motoras suelen ser las más frecuentes (McGavern y cols., 1999), como la espasticidad, debilidad en las extremidades, fallos en la coordinación motora, y en fases más avanzadas (crónicas tardías), parálisis de las extremidades posteriores e incontinencia urinaria.

Diversos agentes terapéuticos, como el IFN β , han sido eficaces en el modelo de TMEV y en el de EAE, mientras que otros que tuvieron éxito en EAE, no ejercieron efectos beneficiosos en el modelo viral, como fue el caso de la linomida (Drescher y cols., 1998).

4. CANNABINOIDES

Los cannabinoides son un grupo de compuestos lipídicos de estructura terpeno-fenólica presentes en la planta *Cannabis sativa*, que activan receptores cannabinoides en el SNC y otros órganos. Teniendo en cuenta su origen, los agonistas de receptores cannabinoides se clasifican en tres grupos: uno lo constituyen los endocannabinoides, derivados de precursores lipídicos de membrana; el siguiente grupo está constituido por los fitocannabinoides, que incluyen el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) y otros compuestos derivados de la planta; y el tercer grupo corresponde a los cannabinoides sintéticos, que presentan afinidad por los receptores cannabinoides, e incluyen por ejemplo el HU-210, el WIN55,212-2 o la araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA).

4.1. Historia

Desde hace miles de años se utiliza el cannabis desde el punto de vista medicinal y recreativo. Los primeros documentos de los que hay constancia sobre su uso medicinal son las farmacopeas de la antigua China, cerca del año 4.000 a.C. En India se utilizaba hacia el año 1.000 a.C. con una connotación religiosa, pero dados los efectos que producía sobre el SNC, es posible que empezase a ser utilizado como analgésico. A lo largo de la historia se han descrito diversos efectos derivados del consumo del cannabis, como por ejemplo, el alivio del dolor en enfermedades inflamatorias, migrañas, ciática y neuralgias, la acción espasmolítica, en diuresis, cistitis y gonorrea, contra hemorragias uterinas, infecciones oculares y del oído, entre otras (Touw, 1981). Además, el

cannabis se ha utilizado, como se ha apuntado antes, de forma recreativa. Sus efectos psicotrópicos, debidos en su mayoría a la concentración de THC, llevaron a la prohibición de su consumo tras la convención de Génova en 1925, y en EEUU en los años 30, desencadenando la ilegalización en casi todos los países del mundo y deteniendo su uso como agente terapéutico. Actualmente, dependiendo del país, se ha legalizado su consumo, en algunos casos con un fin medicinal.

A pesar de las prohibiciones de uso, la investigación sobre el potencial terapéutico del cannabis continuó y dio sus primeros frutos en la década de 1940, cuando se aislaron con éxito los primeros cannabinoides, el cannabino (CBN) y el CBD (Adams y cols., 1940; Figura 6), aunque ninguno de ellos era el causante del efecto psicoactivo del cannabis. El CBD se había obtenido a principios de los 40, pero no fue hasta 1963 cuando se determinó su estructura (Mechoulam y

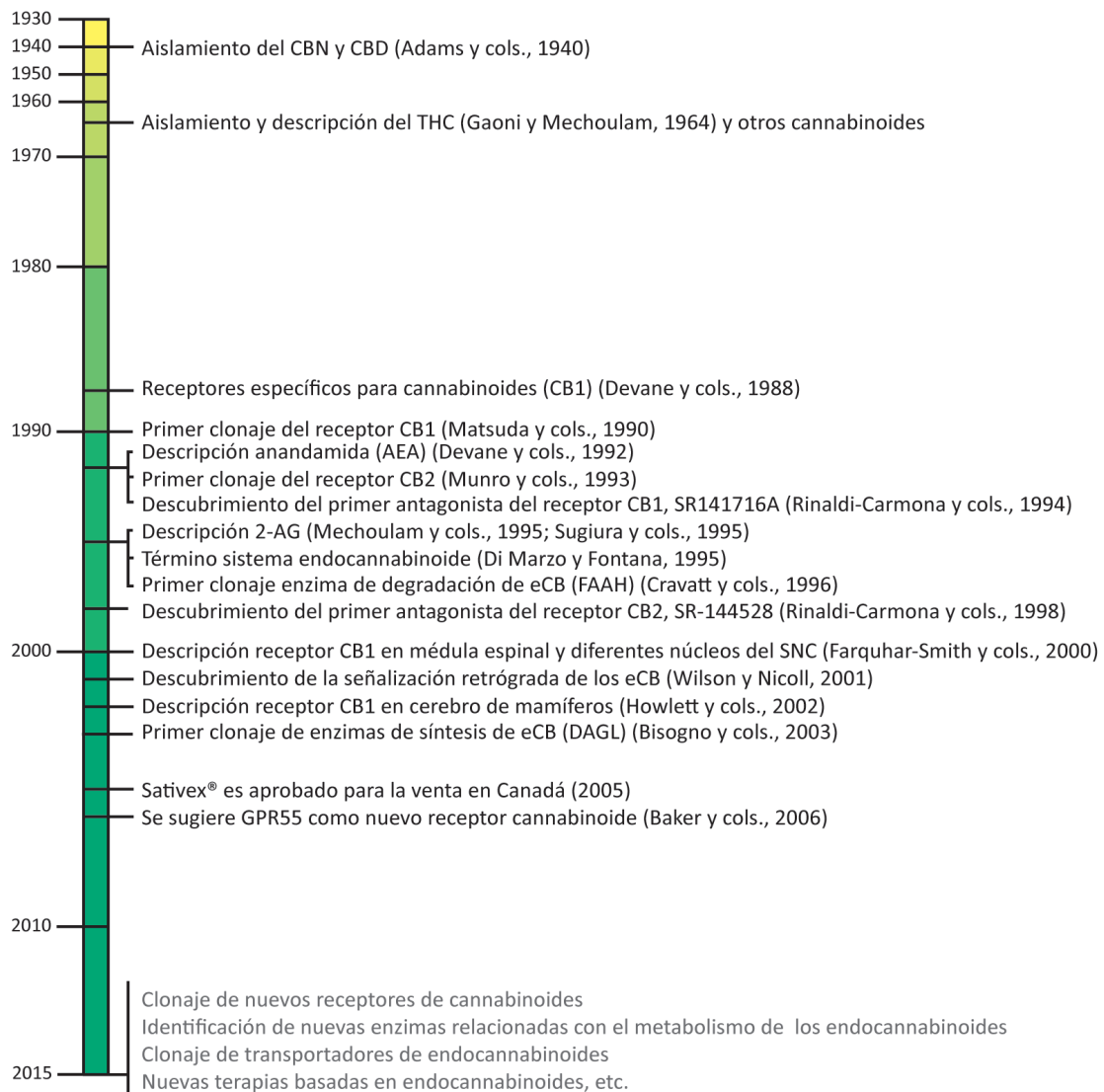


Figura 6. Avances recientes en la investigación de cannabinoides y sistema endocannabinoide.

2-AG, 2-araquidonoilglicerol; AEA, anandamida; CB1, receptor cannabinoide 1; CB2, receptor cannabinoide 2; CBD, cannabidiol; CBN, cannabino; eCB, endocannabinoides; DAGL, diacilglicerol lipasa; FAAH, hidrolasa de amidas y ácidos grasos; THC, tetrahidrocannabinol.

Shvo, 1963). Después, se consiguió aislar el principal componente psicoactivo del cannabis, el THC (Gaoni y Mechoulam, 1964). A partir de ese momento, y gracias a las nuevas técnicas, comenzó a hacerse factible el aislamiento de la mayoría de los cannabinoides. Durante la siguiente década se estableció la estructura de una larga lista de cannabinoides no psicotrópicos, entre los que destacan el cannabícromeno (CBC), cannabíciclol y cannabigerol (CBG, Gaoni y Mechoulam, 1964). Eran grandes avances para la química de los cannabinoides, pero no para la base molecular de la actividad de éstos, que fue un enigma durante décadas. Durante los años 70 y 80 se asumió que el carácter lipofílico de los cannabinoides era la base de su acción farmacológica (Mechoulam y Hanus, 2000), aunque estudios posteriores llegaron a la conclusión de que la psicoactividad asociada a algunos cannabinoides debía de ser el efecto de la activación de algún receptor en cerebro o en neuronas, y fue en 1988 cuando el grupo de Howlett estableció la presencia de un receptor específico de cannabinoides en cerebro de rata (Devane y cols., 1988). Se le denominó receptor CB1, y posteriormente fue clonado por el grupo de Matsuda (Matsuda y cols., 1990).

En el año 1992 el grupo del profesor Mechoulam consiguió aislar un derivado de ácidos grasos y describir la estructura del primer ligando endógeno, la araquidonoiletanolamida (anandamida, AEA; Devane y cols., 1992). Un año después, se consiguió identificar el segundo receptor cannabinoide, el receptor CB2, y también se llevó a cabo su clonaje a partir de bazo de rata (Munro y cols., 1993). El receptor CB2 se localiza mayoritariamente en células del sistema inmune y hematopoyéticas, aunque también se expresa en sistema nervioso. Utilizando los métodos similares que para el descubrimiento de la AEA, Mechoulam y cols. (1995) describieron otro ligando cannabinoide endógeno, el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que presentaba afinidad tanto para el receptor CB1 como para el receptor CB2. Lo mismo fue descrito por Sugiura y cols. (1995) de manera independiente el mismo año.

La demostración de la existencia de receptores específicos y de algunos ligandos endógenos indica la existencia de un nuevo sistema de comunicación intercelular, tanto en SNC como en periferia, que se ha denominado sistema cannabinoide, y que incluye también las enzimas de síntesis y degradación. En 1996, se describió la primera enzima que degrada endocannabinoides, la hidrolasa de amidas y ácidos grasos (FAAH, del inglés *Fatty acid amide hydrolase*) (Cravatt y cols., 1996), y en 2003, se publicó el primer clonaje de una enzima de síntesis de endocannabinoides, la diacilglicerol lipasa (DAGL) (Bisogno y cols., 2003). Actualmente se sigue investigando en esta línea con objeto de establecer nuevos receptores cannabinoides y demostrar la posible existencia de un transportador de cannabinoides del medio extracelular al interior de la célula.

4.2. Sistema cannabinoide

El sistema cannabinoide está involucrado en la regulación de un gran número de funciones fisiológicas en el organismo, como por ejemplo el desarrollo neuronal, la respuesta inmune, el metabolismo y la plasticidad sináptica. Este sistema se compone de diferentes elementos, entre los que se encuentran receptores específicos y ligandos endógenos, además de las enzimas de síntesis y degradación de los mismos. Los ligandos endógenos, también llamados endocannabinoides, están presentes en todos los órganos y son sintetizados a demanda, no acumulándose en vesículas como los neurotransmisores. En respuesta a diversos estímulos celulares, los endocannabinoides se sintetizan o degradan gracias a la acción de diversas enzimas, entre las que se encuentran hidrolasas y aciltransferasas (Di Marzo y Piscitelli, 2015).

4.2.1. Receptores cannabinoides y mecanismos de señalización celular

Se considera que la mayoría de los ligandos cannabinoides actúan activando receptores específicos de superficie celular con siete dominios transmembrana, acoplados a proteínas G. Existen dos receptores cannabinoides bien establecidos, CB1 y CB2, además de otros receptores que se describirán a continuación.

Los receptores cannabinoides se localizan en la membrana plasmática y se activan por ligandos cannabinoides, tanto endógenos como exógenos (Pertwee y Ross, 2002). La estimulación de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 activa numerosas vías de transducción de señales a través de proteínas $G_{i/o}$ (Devane y cols., 1988; Pertwee, 1997; Molina-Holgado y cols., 2002; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007; Figura 7). Cuando se activan los receptores cannabinoides, la subunidad β y γ de la proteína G se separan de la subunidad α , y la subunidad $G_i\alpha$ libera GDP y se une GTP, activándose e inhibiendo la adenilato ciclasa. Esta enzima inactiva es incapaz de estimular la producción de AMPc a partir de ATP, por lo que se inhibe la actividad de la siguiente enzima en la cascada de señalización, la proteína quinasa A (PKA). La reducción en la fosforilación debido a la inhibición de la PKA modula múltiples vías, en las que intervienen canales iónicos y diferentes kinasas los cuales son importantes en los cambios en el citoesqueleto celular o en eventos de transducción de señales y en la plasticidad sináptica. Otra posible vía de acción es que el dímero $G\beta\gamma$ active a una proteína G, rectificando los canales de K^+ , e inhibiendo los canales de Ca^{2+} , regulando así la transmisión sináptica (Díaz-Laviada y Ruiz-Llorente, 2005).

La liberación de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G también conduce a la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), resultando en la fosforilación de tirosina y la activación de Raf-1, y en consecuencia, la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*). Esta cascada de señalización culmina con la regulación de la transcripción de diversos genes.

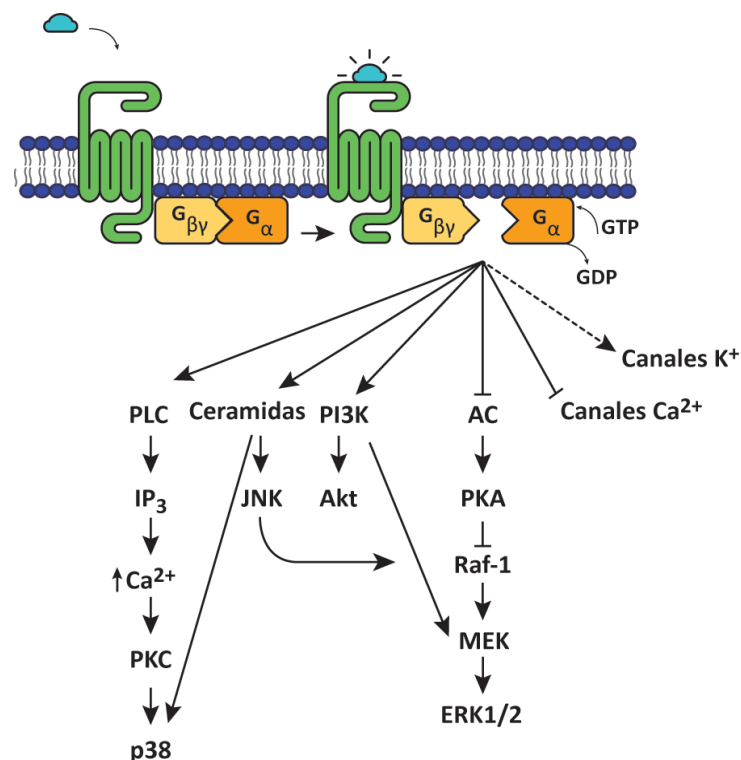


Figura 7. Principales vías de señalización de receptores CB asociados a proteínas G.

4.2.1.1. Receptor CB1: localización y funciones fisiológicas

CB1 es un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G, cuyas señales se dan predominantemente a través de $G_{i/o}$ para inhibir la adenilato ciclasa (Howlett y Fleming, 1984; Howlett y cols., 1986; Matsuda y cols., 1990). El acoplamiento entre CB1 y las proteínas $G_{i/o}$ también activa kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), MAPK y canales rectificadores de K^+ , pero también es capaz de inhibir canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Mackie y Hille, 1992). Está localizado fundamentalmente en la terminal presináptica de las neuronas, regulando retrógradamente la transmisión sináptica mediante la inhibición de la liberación de neurotransmisores.

Se considera el receptor más abundante del SNC y se encuentra mayoritariamente en ganglios basales, corteza cerebral, cerebelo e hipocampo (Matsuda y cols., 1990), mientras que su expresión es menor en tronco cerebral, algunos núcleos del tálamo, amígdala, sustancia gris periacueductal y asta dorsal de la médula espinal (Farquhar-Smith y cols., 2000; Howlett y cols., 2002). Esta localización nos muestra la implicación de los endocannabinoides en el control del movimiento, cognición, memoria y en la modulación del dolor, efectos antieméticos y analgésicos, ya que este receptor abunda en las estructuras que controlan dichas funciones. El receptor CB1 también se expresa en la mayoría de células del sistema inmune, pero en niveles menores que el receptor CB2

(Galiegue y cols., 1995). También se expresa en tejidos periféricos, como el tejido adiposo, hígado, tracto gastrointestinal, células β -pancreáticas y endotelio vascular.

El mecanismo de activación del receptor CB1 es muy variado, y se ha descrito recientemente que puede formar homodímeros con otros receptores CB1 cercanos o uniones con otros receptores formando heterodímeros, como el receptor CB2, receptores adrenérgicos, dopaminérgicos, opioides, receptores de angiotensina, orexigénicos y receptores de adenosina (Navarro y cols., 2008; Przybyla y Watts 2010; Smith y cols., 2010), siendo éste un tema de intensa investigación en el momento actual.

4.2.1.2. Receptor CB2: localización y funciones fisiológicas

El receptor CB2, al igual que CB1, es un receptor que se acopla a proteínas G, con siete dominios transmembrana, y presenta tan sólo un 44% de homología en la secuencia de aminoácidos si se compara con CB1 (Munro y cols., 1993), y un 68% de homología si sólo se consideran las regiones transmembrana.

La localización del receptor CB2 varía respecto de la del receptor CB1. Hasta hace relativamente poco tiempo, se consideraba al receptor CB2 como ajeno al SNC, ya que sus niveles eran altos en células del sistema inmune, como linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células hemato-poyéticas (Munro y cols., 1993; Galiegue y cols., 1995). Sin embargo, estudios posteriores mostraron una distribución del receptor CB2 no tan restringida al sistema inmune, ya que se observó su presencia en cerebro de mamíferos y cultivos celulares de microglía y endotelio cerebral (Golech y cols., 2004; Núñez y cols., 2004; Van Sickle y cols., 2005; Gong y cols., 2006), en células gliales *in vitro* (Stella, 2004) y en situaciones patológicas (Yiangou y cols., 2006; Benito y cols., 2007; Núñez y cols., 2008), y progenitores neurales *in vivo* (Palazuelos y cols., 2006). También se ha localizado la expresión del receptor CB2 en hígado (Julien y cols., 2005), en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Ofek y cols., 2006) y en células secretoras de somatostatina en páncreas (Bermúdez-Silva y cols., 2007).

La activación del receptor CB2 es muy importante en las acciones periféricas ejercidas por los cannabinoides, principalmente en las inmunomoduladoras (Lombard y cols., 2007; Eisenstein y Meissler, 2015), además de otros efectos compartidos con el receptor CB1. En el trabajo de Buckley y cols. (2000), se observó una respuesta defectuosa en diferentes poblaciones de linfocitos T y B en ratones CB2^{-/-}, comparándola con ratones de fenotipo salvaje (*wild type*). Otras acciones mediadas por la activación del receptor CB2 incluyen un papel antiproliferativo (Aguado y cols., 2007; Velasco y cols., 2012).

4.2.1.3. Otros receptores de cannabinoides

Además de los receptores CB1 y CB2, se han descubierto otros receptores capaces de activarse con ligandos cannabinoides. A continuación se describen brevemente.

- *Receptores PPAR*: Los cannabinoides también son capaces de unirse y activar los receptores de la superfamilia de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptors*), que se unen a secuencias de ADN llamadas elementos de respuesta a PPAR, los que a su vez inducen la transcripción de los genes diana tras la activación por ligando (O'Sullivan, 2007). Cada vez hay más trabajos describiendo la activación de receptores PPAR por diferentes cannabinoides, y que éstos receptores pueden estar implicados en muchos efectos biológicos de los endocannabinoides, como en el efecto antiinflamatorio, en el comportamiento relacionado con la alimentación y en la analgesia (O'Sullivan, 2007).

Kozak y cols. (2002) describieron por primera vez que PPAR interaccionaba con el endocannabinoide 2-AG. En un trabajo posterior, Rockwell y Kaminski (2004) evidenciaron un bloqueo de la acción antiinflamatoria de AEA sobre la expresión de IL-2 mediante el uso de un antagonista del receptor PPAR γ , sugiriendo que la AEA podría activar este receptor directamente, o a través de sus metabolitos. A continuación, Bouaboula y cols. (2005) describieron que la AEA se unía directamente a PPAR γ y activaba su actividad transcripcional, al igual que el 2-AG. No todos los endocannabinoides inducen la actividad transcripcional de PPAR γ , como la palmitoiletanolamida (PEA; Lo Verme y cols., 2005), que no presenta afinidad por este receptor nuclear (Bouaboula y cols., 2005). Además, Liu y cols. (2003) mostraron que el cannabinoide sintético ácido ajulémico se unía al receptor e incrementaba la propia actividad transcripcional de PPAR γ , ejerciendo un efecto antiinflamatorio. Así, en los últimos años se ha comprobado el efecto antiinflamatorio (O'Sullivan y Kendall, 2010) y antitumoral de los cannabinoides a través del receptor PPAR γ (Ramer y cols., 2013; Vara y cols., 2013).

- *Canales TRPV*: Algunos endocannabinoides pueden unirse al receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1), un canal iónico no selectivo, permeable tanto a Ca²⁺, como a Na⁺ e H⁺, que pertenece a la familia de los receptores activados por potenciales transitorios (TRPs; Zygmunt y cols., 1999). Este canal se localiza en neuronas dopaminérgicas (Mezey y cols., 2000), pero también en queratinocitos, vejiga, músculo liso, hígado, páncreas, endotelio, linfocitos y macrófagos, entre otros (ver revisión de Starowicz y cols., 2007). La activación de este canal iónico mediante endocannabinoides puede ejercer una función en la vía nociceptora y en vasodilatación, bajo el control de neuronas sensoriales sensibles a capsaicina (Zygmunt y cols., 1999). La activación con capsaicina conlleva una hipoquinesia en ratas (Di Marzo y cols., 2001), y la AEA produce efectos similares en la locomoción, acompañados por una reducción en la actividad de los terminales dopaminérgicos en estriado

(Smart y Jerman, 2000; De Lago y cols., 2004). También se ha descrito la activación del canal iónico TRPV2 con Δ^9 -THC (Neeper y cols., 2007).

- **GPR55:** El receptor acoplado a proteínas G 55 (GPR55) es un receptor con siete dominios transmembrana (Sawzdargo y cols., 1997), con una homología de secuencia con CB1 y CB2 aproximada del 14% (Baker y cols., 2006). Se ha detectado su ARNm mediante Northern blot en médula espinal y en varias regiones del cerebro, entre las que destacan el hipocampo, y los núcleos caudado y putamen (Sawzdargo y cols., 1999), así como en tronco encefálico, cerebelo, corteza cerebral, hipotálamo y estriado mediante RT-PCR (Ryberg y cols., 2007), y en neuronas de ganglios de la raíz dorsal (Lauckner y cols., 2008). GPR55 parece jugar un papel importante en la función vascular (Baker y cols., 2006) y en la coordinación motora (Wu y cols., 2013). El receptor GPR55 también se localiza en diferentes tejidos periféricos, como el bazo, glándulas adrenales y tejido óseo, y está implicado en el metabolismo del tejido adiposo, tracto gastrointestinal y páncreas (Liu y cols., 2015).

En los últimos años está aumentando el interés por el receptor GPR55 en las acciones de los cannabinoides (Brown, 2007; Sharir y Abood, 2010; Liu y cols., 2015). Los endocannabinoides AEA, 2-AG y PEA presentan afinidad por el receptor GPR55 (Ryberg y cols., 2007), activando diferentes rutas. Por ejemplo, la AEA y no el 2-AG, desencadena un incremento de niveles de Ca^{2+} intracelular y activa Rho GTPasas a través de GPR55 (Lauckner y cols., 2008).

4.2.2. Endocannabinoides

Los ligandos endógenos o endocannabinoides son una clase de reguladores lipídicos, entre los que se encuentran amidas y ésteres de ácidos grasos de cadena poliinsaturada. Los endocannabinoides se producen en diferentes órganos y tejidos del organismo, incluido el SNC y periférico.

Los endocannabinoides mejor caracterizados son la AEA y el 2-AG (Figura 8). Asimismo, existen compuestos considerados putativamente como endocannabinoides, como el 2-araquidonoilgliceril-éter (noladin éter), O-araquidonoiletanolamina (virodhamina) (Porter y cols., 2002), N-araquidonoil-dopamina (NADA) y N-oleoildopamina (Pertwee, 2008a). Otros endocannabinoides de la familia de la AEA, las N-aciletanolaminas, presentan actividad cannabimimética, es decir, que reproducen la mayoría de los efectos descritos para los derivados del cannabis. Uno de ellos es la PEA, que tiene efectos analgésicos y antiinflamatorios (Mattace Raso y cols., 2014), o la oleoiletanolamida (OEA), que puede actuar como agonista de los receptores PPAR α o TRPV1 (Pavón y cols., 2010).

El primer endocannabinoides descrito fue la AEA (Devane y cols., 1992). La AEA es un derivado del ácido araquidónico y la etanolamina, y actúa como agonista parcial de los receptores

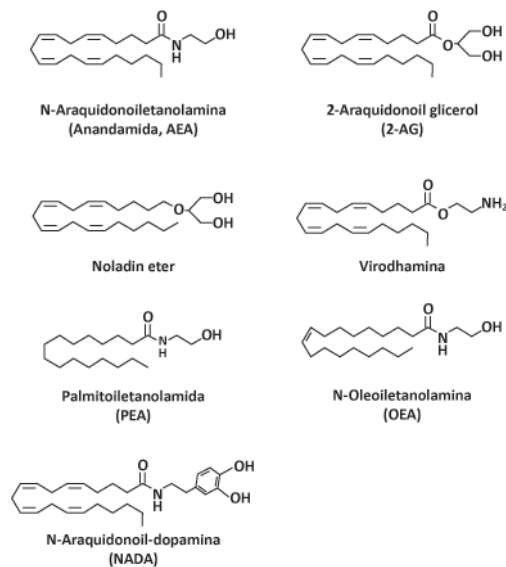


Figura 8. Formulación química de los principales endocannabinoides.

CB1 (Devane y cols., 1992), y como agonista de baja afinidad del receptor CB2. Se ha localizado en cerebro y en tejidos periféricos de oveja, cerdo, vaca, roedores y humano, entre otros. Los niveles más altos de AEA en SNC coinciden con las regiones en las que abunda el receptor CB1, como son el hipocampo, los ganglios basales y el cerebelo, pero también son elevados en tálamo y tronco encefálico, donde la expresión del receptor CB1 es más baja (Bisogno y cols., 1999). A nivel periférico se ha localizado en bazo, donde hay una alta expresión del receptor CB2. En plasma, suero y líquido cefalorraquídeo aparecen trazas (Felder y Glass, 1998), aunque se ha observado que la concentración de AEA aumenta en líquido

cefalorraquídeo en pacientes con EM (Centonze y cols., 2007).

El endocannabinoide más abundante en el SNC es el 2-AG, descubierto como ya se ha comentado por el grupo de Mechoulam (Mechoulam y cols., 1995) y Sugiura y cols. en 1995 de manera independiente, y parece ser un agonista cannabinoide selectivo tanto del receptor CB1 como CB2 (Sugiura y Waku, 2002), pudiendo ejercer su acción durante reacciones inflamatorias, entre otras (Lee y cols., 1995). El 2-AG, además de en cerebro, está presente en otros tejidos y órganos (Sugiura y cols., 2006). Los niveles basales de 2-AG en cerebro son aproximadamente el doble que los de AEA (Giuffrida y cols., 1999), y éstos varían dependiendo de la edad del animal de experimentación y las condiciones fisiológicas en las que se encuentre. En situaciones patológicas, como en el modelo de EM CREAE (del inglés *chronic relapsing EAE*), los niveles de 2-AG en cerebro y médula espinal son más elevados (Baker y cols., 2001) que en condiciones basales. Sin embargo, varios grupos han descrito que los niveles de 2-AG en el modelo de EAE tanto de ratón como rata no varían o incluso disminuyen (Cabranes y cols., 2005; Maresz y cols., 2005).

4.2.2.1. Endocannabinoides: síntesis, recaptación y degradación

La AEA y el 2-AG se sintetizan a demanda y se liberan junto con otros homólogos de la AEA, como la PEA y el 2-linoleoilglicerol. Una vez ejercida su acción biológica, los endocannabinoides se internalizan y degradan en la célula mediante un sistema de recaptación y enzimas hidrolíticas. En neuronas, se ha descrito que los endocannabinoides se sintetizan y liberan en respuesta a un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} o de AMPc, producidos en periodos de actividad del SNC (Mackie, 2006).

La biosíntesis de AEA comienza con un precursor lipídico de membrana, el ácido araquidónico, sobre el que actúa la enzima N-aciltransferasa (NAT) para obtener la N-araquidonoilfosfatidiletanolamida (NAPE; Figura 9). A continuación tiene lugar la hidrólisis enzimática catalizada por la fosfolipasa D (PLD), y tras obtenerse el precursor N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NArPE), la enzima fosfolipasa D (NAPE-PLD) lo hidroliza para dar como productos finales ácido fosfatídico y AEA (Schmid y cols., 1983; Di Marzo y cols., 1994). La NAPE-PLD es dependiente de Ca^{2+} y fue clonada por el grupo de Okamoto y cols. (2007). Esta reacción es también la ruta principal de síntesis de otras N-aciletanolaminas, como PEA, OEA o N-estearoiletanolamina (SEA), y debido a ello, la AEA suele sintetizarse a la vez que estos compuestos, que presentan propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas. Aunque dichas moléculas no presenten afinidad por los receptores CB1 ni CB2, podrían ejercer las funciones antes mencionadas a través de los receptores GPR55, PPAR α o los canales TRPV1. En cuanto a la degradación de AEA, la principal vía es a través de la hidrolasa de ácidos grasos FAAH (McKinney y Cravatt, 2005), aunque puede ser sustrato de la COX-2.

Respecto a la síntesis de 2-AG, la hidrólisis de fosfoinositol bis-fosfato catalizada por la enzima fosfolipasa C (PLC) da lugar a diacilglicerol (DAG). Dos DAG lipasas (DAGL α y DAGL β), catalizan la reacción que transforma el DAG a 2-AG. Estas DAGL se sitúan en la membrana post-sináptica, sintetizando el 2-AG involucrado en la transmisión retrógrada. Una vez que el 2-AG ejerce su función, éste es hidrolizado fundamentalmente por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Dinh y cols., 2002), y en menor medida, por α,β -hidrolasa (ABDH)-6 y ABDH12 (Freund y cols., 2003; Litchman y cols., 2012). La MAGL se localiza en el terminal presináptico, mientras que la FAAH se encuentra en el terminal postsináptico (Gulyas y cols., 2004).

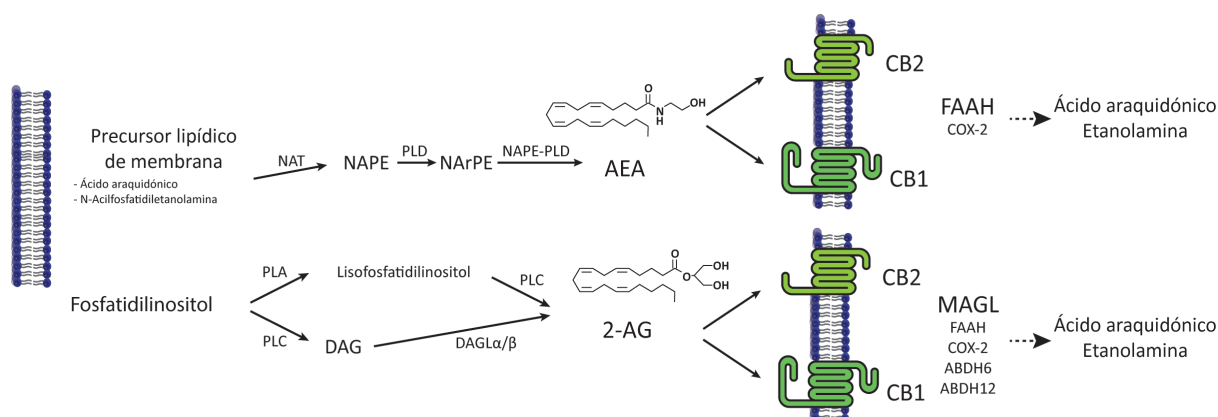


Figura 9. Principales rutas de síntesis y degradación de los endocannabinoides AEA y 2-AG a partir de precursores lipídicos de membrana. 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; AEA: anandamida; DAG: diacilglicerol; DAGL: DAG lipasa; FAAH: hidrolasa de amidas y ácidos grasos; MAGL: monoacilglicerol lipasa; NAPE: N-araquidonoilfosfatidiletanolamida; NAPE-PLD: fosfolipasa D específica de NAPE; NAT: N-acetiltransferasa; PLA: fosfolipasa A; PLC: fosfolipasa C.

Se desconoce y es motivo de debate la existencia de transportadores y mecanismos de recaptación de AEA y 2-AG (McFarland y Barker, 2004; Glaser y cols., 2005), aunque recientemente Chicca y cols. (2012) han propuesto la existencia de un transportador de membrana de endocannabinoides, que junto con la hidrólisis intracelular, reducirían los niveles de AEA y 2-AG del medio extracelular.

4.3. Compuestos cannabinoides

Los cannabinoides se pueden definir como compuestos estructuralmente relacionados con el Δ^9 -THC, el principal componente psicoactivo de *Cannabis sativa*, y otros compuestos que interactúan con los receptores CB. Existen algunas excepciones, como el HU-221 (dexanabinol), que es un cannabinoide en el sentido químico, pero no interactúa con los receptores CB (Feigenbaum y cols., 1989), mientras que la ACEA es un agonista selectivo del receptor CB1, pero no tiene una estructura parecida a la del THC (Hillard y cols., 1999).

Los compuestos cannabinoides afectan a numerosas funciones biológicas, como la memoria a corto plazo y la coordinación motora, además de exhibir propiedades neuromoduladoras, neuroprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias, entre otras (Mechoulam y Hanus, 2000).

4.3.1. *Cannabis sativa* y los fitocannabinoides

El cannabis se extrae de la planta *Cannabis sativa* L., perteneciente a la familia Cannabaceae, de la que sólo se ha descrito un género, Cannabis, con tan sólo una especie (*C. sativa*), aunque existen distintas subespecies y variedades de éstas.

Debido al alto número de compuestos existentes en la planta, la química asociada al cannabis es muy compleja, ya que se pueden dar interacciones entre los distintos componentes. Se han descrito más de 480 compuestos químicos, entre los que abundan los terpenos, cannabinoides e hidrocarburos, y en menor medida, azúcares, compuestos nitrogenados, fenoles no cannabinoides y flavonoides, entre otros. Los cannabinoides mejor descritos son los terpeno-fenólicos con 21 carbonos. De los más de 480 compuestos descritos en la planta, se han descrito cerca de 80 compuestos terpeno-fenólicos denominados fitocannabinoides, que no han sido detectados en otras plantas.

Los fitocannabinoides son compuestos liposolubles que presentan un gran potencial terapéutico, según publicaciones de los últimos años, en enfermedades que afectan al SNC, en particular la EM. En la Figura 10 se muestran las rutas de biosíntesis de los principales fitocannabinoides. Actualmente, una buena opción para la industria farmacéutica es la búsqueda de nuevos compues-

tos con potencial terapéutico basados en fitocannabinoides que no ejerzan efectos psicotrópicos, pero que sí tengan actividad farmacológica, ya que una vez descritos los mecanismos de acción, podrían considerarse buenos candidatos para combatir enfermedades del SNC. Los últimos estudios farmacológicos con cannabinoides no psicotrópicos han utilizado la Δ^9 -tetrahidrocannabivarina (THCV), Δ^9 -tetrahidrocannabiorcol (THCO), cannabicromeno (CBC), y el cannabigerol (CBG), entre otros, mostrando una actividad analgésica y antiinflamatoria (Hill y cols., 2012).

Una característica de gran interés es que la planta *Cannabis sativa* puede ser manipulada genéticamente para alterar los ratios relativos a los fitocannabinoides producidos. Este aspecto merece ser considerado, ya que la modulación del ratio de fitocannabinoides específicos en extractos estandarizados de cannabis puede ofrecer no sólo un mejor potencial terapéutico, sino también proporcionar un modelo para la industria farmacéutica para el desarrollo de medicinas basadas en cannabis. A continuación se detallarán las características de los cannabinoides más abundantes en la planta.

- Δ^9 -THC: El componente más abundante en *Cannabis sativa* es el Δ^9 -THC, que provoca importantes efectos psicoactivos al activar el receptor CB1. El THC también presenta afinidad por el receptor CB2 (Pertwee, 1997; Howlett, 2002), al igual que por el receptor PPAR γ y los canales iónicos TRPV1 (Pertwee, 2008b). Entre los efectos terapéuticos que se asocian al THC

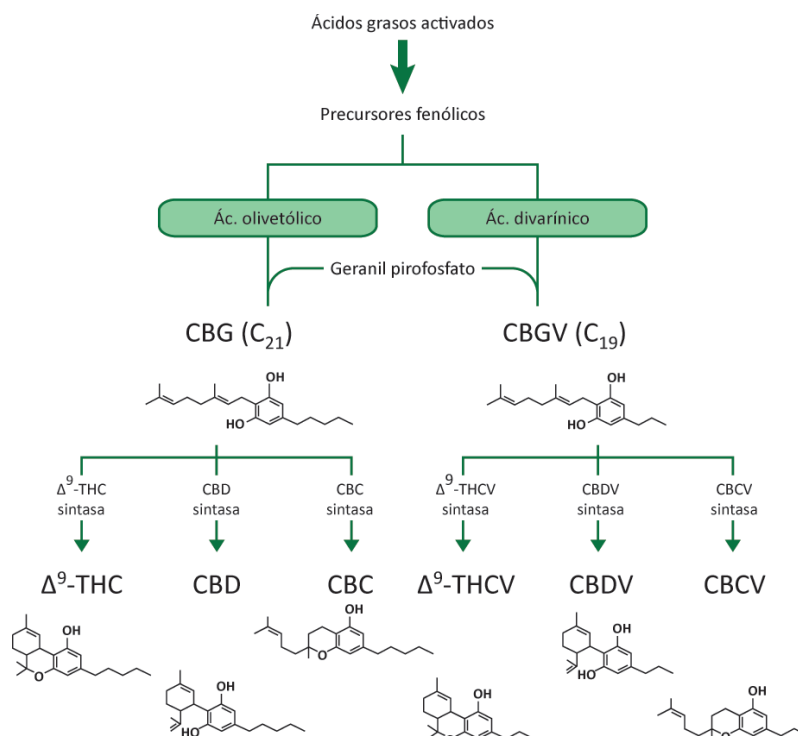


Figura 10. Biosíntesis y formulación química de los principales fitocannabinoides (modificada de Hill y cols., 2012). CBC: cannabicromeno; CBCV: cannabicromevarina; CBD: cannabidiol; CBDV: cannabidivarina; CBG: cannabigerol; CBGV: cannabigerovarina; THC: tetrahidrocannabinol; THCV: tetrahidrocannabivarina.

se encuentran efectos analgésicos (Fox y Bevan, 2005), antiinflamatorios, antieméticos, acciones sobre la actividad muscular, efectos cardiovasculares, neuroendocrinos, inmunomoduladores y antiproliferativos, entre otros. En general, la mayoría de efectos inmunomoduladores del THC se han asociado a la activación del receptor CB2, pero también al receptor CB1 (Nagarkatti y cols., 2009). También se utiliza para potenciar el apetito en pacientes de SIDA y como antiemético en pacientes de cáncer que reciben quimioterapia. El THC forma parte del compuesto Sativex[®], comercializado para espasticidad y dolor neuropático en pacientes de EM (en combinación con CBD, en una proporción aproximada de 1:1), y como anestésico en pacientes con cáncer (Russo y cols., 2007).

- *CBD*: El CBD constituye cerca del 40% del extracto de la planta, y es el fitocannabinoides no psicotrópico más abundante (Hanus, 2009). Su estructura y configuración no fue descrita hasta los años 60 (Gaoni y Mechoulam, 1964; Mechoulam y cols., 1970), y presenta propiedades analgésicas, antiinflamatorias (Li y cols., 2013), antioxidantes, neuroprotectoras, antitumorales (McAllister y cols., 2007) y antiepilépticas (Devinsky y cols., 2014), inhibe la náusea y el vómito (Parker y cols., 2011), además de carecer de efectos psicotrópicos y cognitivos. Cabe destacar la relevancia que está tomando el CBD en la investigación como tratamiento de la esquizofrenia (Iseger y Bossong, 2015). Este fitocannabinoides tiene una farmacología compleja, ya que no presenta afinidad por los receptores CB1 y CB2 pero puede actuar como antagonista (Thomas y cols., 2007), es agonista de los canales iónicos TRPV1 y 2 (De Petrocellis y cols., 2008; Qin y cols., 2008), del receptor PPAR γ (O'Sullivan y cols., 2009), del receptor de serotonina 5-HT_{1A} (Mechoulam y cols., 2007) y también del receptor de adenosina A_{2A} (Mecha y cols., 2013b). Además, el CBD es antagonista del receptor GPR55 (Ryberg y cols., 2007).

- *CBG*: Es el precursor de los fitocannabinoides más abundantes en el extracto de la planta, el THC y CBD. El CBG es un cannabinoides no psicotrópico aislado en 1965 por Gaoni y Mechoulam, el cuál no induce efectos similares al THC (Mechoulam y cols., 1970). Este fitocannabinoides es agonista parcial de los receptores CB1 y CB2 (Izzo y cols., 2009; Hill y cols., 2012) y del receptor PPAR γ (Granja y cols., 2012). El CBG presenta propiedades antiproliferativas en células cancerosas (Ligresti y cols., 2006) y antibacterianas (Appendino y cols., 2008). Las acciones del CBG tienen como diana los canales TRP (De Petrocellis y cols., 2011), el receptor adrenérgico $\alpha 2$ (Cascio y cols., 2010) y puede actuar como antagonista del receptor de serotonina 5-HT_{1A}.

4.3.2. Antagonistas de cannabinoides

Existen algunos antagonistas selectivos para el receptor CB1, a pesar de que muchos muestran agonismo inverso. El primer antagonista en describirse fue el SR141716A (Rimonabant; Rinaldi-Carmona y cols., 1994), al que posteriormente se ha sometido a modificaciones con el fin de

incrementar la afinidad por el receptor, sintetizando los agonistas inversos AM251 y AM281 (Gatley y cols., 1996; Lan y cols., 1999). Otros antagonistas del receptor CB1 son el LY320135 (Felder y cols., 1998), NESS 0327 (Ruijter y cols., 2003), PF-095453 y CE-178253 (Mnich y cols., 2010), o el MJ08 (Chen y cols., 2011).

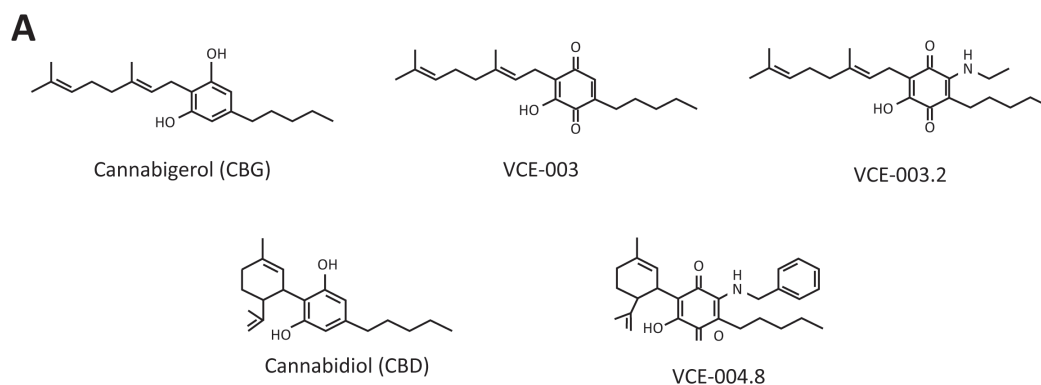
Respecto a los antagonistas/agonistas inversos del receptor CB2, la primera molécula que se sintetizó fue un análogo del rimonabant, el SR144528 (Rinaldi-Carmona y cols., 1998). Otros fármacos usados son el AM630, O-1184 (Ross y cols., 1998) o el JTE-907.

4.3.3. Nuevos fitocannabinoides: Descripción de VCE-003, VCE-003.2, VCE-006 y VCE-004.8

Mientras que los fitocannabinoides clásicos como el THC provocan efectos tanto a nivel de SNC como en periferia activando los receptores CB1 y CB2 (Howlett y cols., 2002), otros fitocannabinoides pueden actuar en otro tipo de receptores. Como se ha comentado antes, estudios *in vitro* han mostrado que el CBG es un agonista del receptor adrenérgico y antagoniza los receptores de serotonina 5-HT_{1A} (Cascio y cols., 2010). También se ha visto que es capaz de activar TRPV1, TRPV2 y TRPA1 (TRP, subfamilia A1), y es antagonista del receptor TRPM8 (TRP de la subfamilia M8, receptor de frío y mentol) *in vitro* (De Petrocellis y cols., 2008; 2011).

La propuesta que han hecho últimamente algunos grupos de investigación y empresas farmacéuticas es la de mejorar la afinidad de compuestos derivados de la planta por receptores cannabinoides, para aumentar la eficacia terapéutica en diferentes enfermedades, como por ejemplo la enfermedad de Huntington, Parkinson, EM o artritis reumatoide. Es el caso de los compuestos utilizados en esta tesis doctoral, que se describen a continuación.

El principal derivado cannabinoide que se ha utilizado en esta tesis doctoral es el VCE-003, un derivado quinona del CBG, con una modificación de oxidación en la fracción de resorcinol (Figura 11). Dicha modificación resulta en una mejora en la afinidad del compuesto por el receptor de PPAR γ (IC₅₀=12,7 μ M del CBG a 2,2 μ M del VCE-003; Granja y cols., 2012), y por el receptor CB2 (IC₅₀=16,07 μ M del CBG a 1,76 μ M del VCE-003; Granja y cols., 2012), pero no posee afinidad por el receptor CB1 (IC₅₀>40 μ M tanto en el caso del CBG como para el VCE-003; Granja y cols., 2012). También se ha utilizado el compuesto VCE-003.2, un derivado de VCE-003 que actúa como modulador de receptores PPAR (IC₅₀=1,2 μ M; Díaz-Alonso y cols., en preparación). Además, se ha estudiado el efecto terapéutico del VCE-006, un compuesto formado por dos moléculas de VCE-003.



B

Compuesto	CB1-Ki (μM)	CB2-Ki (μM)	PPAR γ -IC ₅₀ (μM)
CBG	>40 ^a	16,07 ^a	12,7 ^a
VCE-003	>40 ^a	1,76 ^a	2,2 ^a
VCE-003.2	>40 ^b	>40 ^b	1,2 ^b
CBD	>10 ^c	>10 ^c	20,1 ^a
VCE-004.8	>40 ^d	0,17 ^d	1,70 ^d

Figura 11. Formulación química (A) y afinidad por los receptores CB1, CB2 y PPAR γ de los derivados de fitocannabinoides utilizados (B). ^aGranja y cols. (2012); ^bDíaz-Alonso, en preparación; ^cBisogno y cols. (2001); ^dDel Río y cols. (2016).

Otro compuesto utilizado en esta tesis doctoral ha sido un derivado quinona del CBD, VCE-004.8, que actúa como modulador de receptores PPAR ($\text{IC}_{50}=1,7 \mu\text{M}$) y como agonista del receptor CB2 ($\text{Ki}=170 \text{ nM}$; Del Río y cols., 2016) (Figura 11).

4.4. Esclerosis múltiple y cannabinoides

Durante el desarrollo de la EM, en el SNC tiene lugar un proceso neuroinflamatorio y neurodegenerativo que involucra numerosos mecanismos. Como se ha comentado en apartados anteriores, la enfermedad podría comenzar con la activación de la respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T autorreactivos, que responderían contra antígenos del SNC y se desencadenarían la respuesta inflamatoria con producción de citoquinas, quimioquinas y mediadores tóxicos, como ROS y metabolitos del óxido nítrico (Bauer y cols., 1995; Grundy y cols., 2001). Los cannabinoides (endocannabinoides, fitocannabinoides o cannabinoides sintéticos) son capaces de regular estos procesos a distintos niveles, y se ha asociado, en general, la neuroprotección a la acción de los cannabinoides activando el receptor CB1, y la modulación de la respuesta inflamatoria a la activación del receptor CB2 (Maresz y cols., 2007). Por ello son buenos candidatos como agentes terapéuticos inmunomoduladores/neuroprotectores en enfermedades como la EM y sus modelos animales.

4.4.1. Los cannabinoides como agentes neuroprotectores e inmunomoduladores

Una característica importante de la EM es el daño axonal observado en lesiones, que se incrementa con el tiempo (Trapp y cols., 1998). Además del ambiente inflamatorio crónico, hay que tener en cuenta la excitotoxicidad debida a un incremento en los niveles de glutamato (Kostic

y cols., 2013), que altera prácticamente todas las funciones fisiológicas de las células del SNC, desembocando en eventos patológicos muy heterogéneos.

El potencial terapéutico de los cannabinoides en cuanto a su capacidad neuroprotectora se ha evaluado en modelos de EM, como la EAE y TMEV. Su acción a través del receptor CB1 (Kaplan, 2013) se ha descrito en EAE (Pryce y cols., 2003; Kozela y cols., 2011; Lou y cols., 2011; De Lago y cols., 2012) y en el modelo de TMEV (Arévalo-Martín y cols., 2003; Croxford y Miller, 2003; Mestre y cols., 2005; Loría y cols., 2008; Mecha y cols., 2013b), entre otros. El grupo de Baker y cols. indujo el modelo de EAE en ratones *knock out* (KO) para el receptor CB1, y comprobaron que los animales presentaban mayor neurodegeneración, comparados con ratones *wild type* (Pryce y cols., 2003; Jackson y cols., 2005). Posteriormente se ha descrito que la neuroprotección ejercida a través de la activación del receptor CB1 en neuronas en el modelo de EAE (Maresz y cols., 2007), es independiente de la activación del receptor CB2 (Croxford y cols., 2008). Otros estudios han referido un efecto neuroprotector en neuronas ganglionares de la retina frente a excitotoxicidad producida por AMPA a través de la activación del receptor CB1 (Kokona y Thermos, 2015). Respecto a la neuroprotección ejercida por la activación del receptor CB2, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que este receptor es una buena diana farmacológica para disminuir la muerte neuronal en numerosas enfermedades neurodegenerativas, tanto agudas como crónicas (consultar la revisión de Fernández-Ruiz y cols., 2007). En el modelo de EAE, la activación de receptores CB2 conlleva una acción neuroprotectora, como observaron Wen y cols. (2015) tras la administración del antagonista AM630 y también con ratones KO para CB2.

Además, existen numerosas acciones que inducen neuroprotección que son independientes de la activación de los receptores CB1 y CB2, como por ejemplo la mejora de los síntomas de la EAE bloqueando el receptor de NMDA directamente con dextranabinol (HU-211) (Achiron y cols., 2000), o el tratamiento con PEA, que se une al receptor PPAR γ ejerciendo propiedades neuroprotectoras (Loría y cols., 2010).

Otra característica de los cannabinoides es su papel inmunomodulador, principalmente a través del receptor CB2. Diversos estudios han demostrado que la activación crónica de la microglía juega un papel fundamental en EM (Matsumoto y cols., 1992), ya que puede amplificar el daño mediante la secreción de TNF α , IL-1 e IL-12 (Aloisi y cols., 2000; Ashton y Glass, 2007). En experimentos *in vitro*, estudios de nuestro laboratorio han mostrado la implicación de los endocannabinoides en inducir cambios del fenotipo microglial proinflamatorio a antiinflamatorio (Mecha y cols., 2015), y reducir los niveles de TNF α y otras citoquinas proinflamatorias en astrocitos de ratón activados con el virus de Theiler (Molina-Holgado y cols., 1997), al igual que en microglía estimulada con LPS (Molina-Holgado y cols., 2003). En modelos *in vivo*, concretamente en el modelo de TMEV, el uso de UCM707 como inhibidor de la recaptación de AEA produce una acu-

mulación de este endocannabinoide, reduciendo así la activación microglial y los niveles de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β e IL-6 (Ortega-Gutiérrez y cols., 2005), IL-12 e iNOS (Mestre y cols., 2005). El compuesto WIN55,212-2 reduce también los niveles de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IFN γ e IL-6 en el modelo de TMEV (Croxford y Miller, 2003).

En el modelo de EAE, también se han estudiado los efectos antiinflamatorios de los cannabinoides a través del receptor CB1, en concreto, la disminución de $\text{TNF}\alpha$ reduce las alteraciones en las corrientes postsinápticas mediadas por glutamato (EPSCs, del inglés *excitatory postsynaptic currents*; Rossi y cols., 2011). Se piensa que dichas corrientes pueden contribuir a la excitotoxicidad observada en el modelo de EAE. De Lago y cols. (2012) describieron efectos antiinflamatorios, además de neuroprotectores, con el tratamiento con WIN55,212-2 en el modelo de EAE, apoyando lo observado previamente en el modelo de Theiler (Arévalo-Martín y cols., 2003).

También se ha observado que las ROS y las del nitrógeno aumentan desmesuradamente durante procesos inflamatorios en el SNC, induciendo estrés oxidativo e incluso muerte celular (Smith y cols., 1999), y que los cannabinoides son capaces de proteger contra dicho daño por estrés oxidativo en EM (Giacoppo y cols., 2015), inhibiendo iNOS.

4.4.2. Aproximaciones terapéuticas con cannabinoides en EM

Los tratamientos actuales para EM se pueden clasificar principalmente en cuatro categorías: tratamientos sintomáticos, tratamientos para brotes (corticoesteroides), tratamientos modificadores de la enfermedad, y otros tratamientos, que incluyen fisioterapia. Aunque existe un incremento en el número de tratamientos modificadores de la enfermedad, mayoritariamente están enfocados a reducir el número de brotes en fases tempranas de la EM. Actualmente no existen tratamientos eficaces para la EM progresiva, y respecto al tratamiento con cannabinoides, el estudio CUPID (del inglés *Cannabinoid Use in Progressive Inflammatory brain Disease*) de Ball y cols. (2015) confirma que nunca se ha realizado un estudio clínico en el que se hayan utilizado cannabinoides para alterar el curso de la enfermedad en la etapa progresiva de la EM.

Las aproximaciones terapéuticas con cannabinoides comercializados que se contemplan para EM se describen a continuación, teniendo en cuenta el estado de evolución y severidad de la patología en cada paciente, y el país donde se prescriban los cannabinoides.

- *Naxibimols*: El naxibimols (Sativex[®], GW Pharmaceuticals; Reino Unido) ha sido un fármaco multidiana pionero, compuesto por fitocannabinoides. Sativex[®] está constituido aproximadamente en un ratio 1:1 por extractos botánicos de dos variedades de cannabis, una que produce predominantemente THC y otra que produce CBD (aproximadamente, cada 100 μl de pulverizador contienen 2,7 mg THC y 2,5 mg CBD). Puede ser administrado por tabletas sublinguales, espray

oral e inhalado (no fumado). Este compuesto fue aprobado para el tratamiento de espasticidad en EM en numerosos países (Wade y cols., 2004; Perras, 2005), y en Canadá, desde 2007, también está aprobado su uso contra dolor neuropático en EM y cáncer (Novotna y cols., 2011; Langford y cols., 2013). Desde 2010 está aprobado para su uso en nuestro país.

- *Dronabinol*: El dronabinol (Marinol[®], Solvay Pharmaceuticals, Inc; Bélgica) es un compuesto basado en el THC sintético, que ha sido comercializado y se utiliza para el tratamiento del dolor, pero sobre todo como antiemético en pacientes que reciben quimioterapia (en EEUU desde 1985). En el estudio de Svendsen y cols., (2004), tuvo un efecto analgésico modesto pero clínicamente relevante en enfermos de EM con dolor neuropático. Aunque se ha utilizado como tratamiento para la EM progresiva, el estudio de Zajicek y cols. (2013) ha demostrado que el tratamiento oral no presenta ningún efecto sobre de la EM progresiva.

- *Nabilona*: La nabilona (Cesamet[®], Valeant Pharmaceuticals North America; Canadá) es un análogo sintético del THC. Este compuesto es unas 7-8 veces menos potente que el dronabinol, y presenta menos efectos psicotrópicos (Grotenhermen y Müller-Vahl, 2012), reduce el dolor pero no mejora la espasticidad de los pacientes. También se utiliza para el tratamiento de náuseas y vómitos en pacientes de síndrome piramidal (Wissel y cols., 2006). En Reino Unido, se usa para tratar los efectos de la quimioterapia en pacientes de cáncer.

- *Rimonabant*: También conocido como SR141716A, el Rimonabant (Acomplia[®], Sanofi Aventis; Francia) es un antagonista del receptor CB1 que fue el primer tratamiento de este tipo en comercializarse (2006) para el tratamiento de la obesidad. El compuesto es capaz de atravesar la BHE y producir un amplio rango de efectos psicoactivos en humanos a una dosis de 20 mg al día (Padwal y Majumdar, 2007), e incrementa la excitabilidad del sistema motor a nivel cortical y espinal (Oliviero y cols., 2012). Sin embargo, debido a los efectos adversos, como diarrea, náuseas y mareos, y efectos psiquiátricos tales como ansiedad, depresión e incremento de la tasa de suicidios (Padwal y Majumdar, 2007), la agencia europea del medicamento (EMA) lo retiró del mercado en 2009.

- *Ácido ajulémico (CT-3)*: Es un análogo sintético del 11-COOH-THC, el principal metabolito del THC. No presenta actividad psicotrópica (George y cols., 2008), y muestra efectos antiinflamatorios y analgésicos en humanos (Karst y cols., 2003).

En la revisión de Wang y cols. (2008) sobre estudios clínicos y los efectos adversos del uso medicinal de los cannabinoides (dronabinol, Sativex[®] y extractos botánicos de cannabis), no encontraron una mayor tasa de incidencia de efectos adversos serios asociada al uso médico de cannabinoides. En un meta-análisis realizado por Iskedjian y cols. (2007), el Sativex[®], CBD y el dronabinol se mostraron efectivos para tratar pacientes con daño neuropático o con enfermedades como la EM o similares.

II. Objetivos

La EM es una enfermedad compleja con una clínica heterogénea, en la que están implicados distintos mecanismos patogénicos, como la autoinmunidad, la inflamación y la degeneración. La contribución de cada uno de estos mecanismos puede ser diferente entre subgrupos de pacientes, lo que tiene importantes implicaciones en el desarrollo de estrategias terapéuticas, porque la heterogeneidad también se manifiesta en la respuesta al tratamiento. En la actualidad la EM carece de un tratamiento curativo, aunque existen diferentes terapias que alivian, retrasan o frenan la progresión de la misma. Los síntomas en la EM afectan en gran medida a la calidad de vida de los pacientes que, en general, acumulan una discapacidad progresiva, por lo que es importante establecer tratamientos innovadores dirigidos a modificar el curso de la enfermedad.

En los últimos años, se viene investigando el potencial terapéutico de diferentes compuestos cannabinoides puede resultar beneficioso como tratamiento para diferentes enfermedades con componente inflamatorio y/o degenerativo. La comercialización del fármaco Sativex® ha abierto la puerta a la investigación sobre derivados naturales de la planta *Cannabis sativa* como posibles tratamientos para enfermedades como la EM. En esta tesis doctoral, nuestro laboratorio ha participado junto con el grupo de Inmunología de la Universidad de Córdoba que dirige el Prof. Eduardo Muñoz y con la empresa VivaCell Biotechnology Spain S.L., en la caracterización de nuevos compuestos generados a partir de fitocannabinoides no psicotrópicos para su posible uso en el tratamiento de la EM.

Por ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha consistido en la investigación del potencial terapéutico de cuatro nuevos derivados quinona de fitocannabinoides, tres de ellos derivados del CBG (VCE-003, VCE-003.2 y VCE-006) y uno del CBD (VCE-004.8), utilizando los dos modelos animales de EM de uso más extendido, TMEV-IDD y EAE, que apoyan la etiología viral o autoinmune de la EM, respectivamente. Los objetivos concretos se detallan a continuación:

1. Estudio del perfil biológico del compuesto VCE-003: aproximación *in vitro*.
2. Valoración clínica e histopatológica del tratamiento con el compuesto VCE-003 en los modelos TMEV-IDD y EAE.
3. Evaluación clínica del tratamiento con los compuestos derivados de VCE-003, VCE-003.2 y VCE-006, en el modelo de EAE.
4. Estudio *in vitro* del perfil neuroprotector y antiinflamatorio del compuesto VCE-004.8 y valoración clínica e histopatológica del tratamiento con el compuesto VCE-004.8 en los modelos TMEV-IDD y EAE.

III. Métodos experimentales y material

1. MÉTODOS EXPERIMENTALES

En el desarrollo de la presente tesis doctoral se emplearon ratones hembra *Mus musculus* de la cepa susceptible SJL/J de 4-6 semanas de edad (Harlan Laboratories; Barcelona, España) que se infectaron con el virus de Theiler, y ratones hembra de la cepa C57BL/6 (Harlan Laboratories; Barcelona, España) de 6-8 semanas para los experimentos de inmunización con MOG₃₅₋₅₅.

Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum*, y fueron mantenidos en el animalario del Instituto Cajal (CSIC) en condiciones controladas de temperatura (22°C), en un ciclo diario de luz/oscuridad de 12 horas, en jaulas con enriquecimiento ambiental. Todos los experimentos se han realizado según la regulación del gobierno y la Unión Europea (Decreto 53/2013 BOE n°34 y Comunidad de Madrid: ES280790000184). El comité de ética sobre experimentación animal del Instituto Cajal (CSIC) aprobó todos los experimentos realizados en esta tesis doctoral.

El servicio de Animalario del Instituto Cajal cumple todas las recomendaciones sobre alojamiento del convenio del Consejo de Europa ETS 123 y la normativa vigente sobre Experimentación y Protección de los Animales utilizados en Experimentación y otros Fines Científicos reflejada en el RD 53/2013 y la Ley 6/2013.

1.1. Modelos animales de esclerosis múltiple

1.1.1. Modelo de encefalomiелitis murina desmielinizante inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD)

El virus de Theiler (cepa DA), cedido por el Dr. Moses Rodríguez (Clínica Mayo; Rochester, NY, EEUU), fue inoculado intracranealmente en el hemisferio cerebral derecho en ratones de la cepa susceptible SJL/J, con 2×10^6 unidades formadoras de placa (ufp) en 30 μ l de medio DMEM enriquecido con 5% de suero fetal de ternero (FCS, del inglés *Fetal calf serum*) (Lledó y cols., 1999). Los ratones Sham fueron inoculados sólo con vehículo (DMEM + 5% FCS). La evolución de estos animales se controló periódicamente hasta su sacrificio.

1.1.1.1. Diseño experimental

Una vez iniciada la sintomatología, entre los 60-80 dpi (dependiendo del experimento, Figura 12), los ratones fueron sometidos a los diferentes tratamientos que se administraron por vía intraperitoneal durante los 14 días consecutivos con el compuesto VCE-003 (1 mg/kg, 5 mg/kg ó 10 mg/kg), VCE-004.8 (10 mg/kg), vehículo (DMSO/PBS) o DMF (15 mg/kg, este último mediante sonda intragástrica), según el grupo/experimento correspondiente.

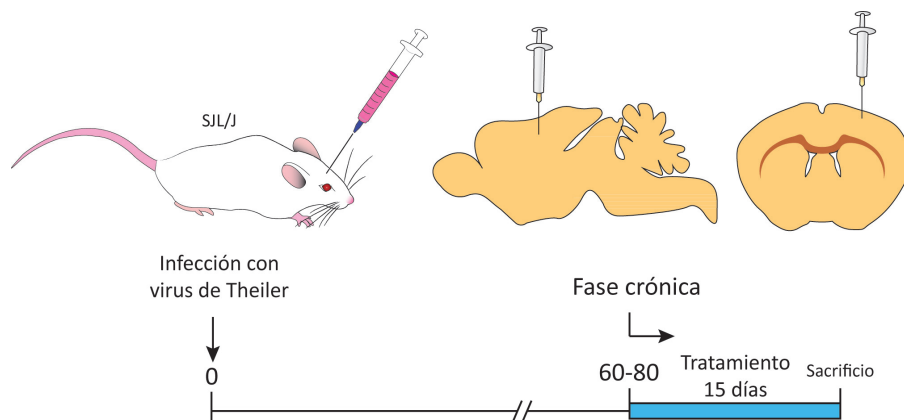


Figura 12. Esquema del desarrollo del experimento con el modelo de TMEV-IDD.

1.1.1.2. Evaluación de la función motora (caja de actividad)

Para evaluar las deficiencias motoras debido al deterioro neurológico de los ratones infectados con el virus de Theiler, se utilizó la prueba de la caja de actividad motora o actímetro (Figura 13; Activity monitor System Omnitech electronics, Inc.; Columbus, OH, EEUU), que consistió en introducir a los animales en una caja de metacrilato con sensores, que detecta la actividad horizontal del animal (exploración espontánea) y la actividad vertical (compromiso de las extremidades inferiores) como número de interrupciones del haz del láser del sensor, durante dos ciclos consecutivos de 5 minutos cada uno. Los resultados se analizaron con el software Digiscan. Los datos obtenidos se relativizaron a los animales control como 100% de movimiento.



Figura 13. Ratones SJL/J en el actímetro y localización de los sensores en la caja.

1.1.2. Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

Se calculó la cantidad necesaria de todos los compuestos, según lo siguiente: 300 µg/ratón de MOG₃₅₋₅₅ en PBS (100 µl/ratón), y 800 µg/ratón de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA en adyuvante incompleto de Freund (100 µl/ratón). Después de esto, se procedió a sonicar con ultrasonido el eppendorf que contenía la mezcla de *Mycobacterium* y adyuvante incompleto de Freund para disolverlo mejor, y se pasó a un tubo de cristal. A continuación, se añadió gota a gota la MOG₃₅₋₅₅, agitando con vortex en todo momento. De esta suspensión se inyectó subcutáneamente 200 µl a cada ratón (previamente anestesiados inhalatoriamente con isoflurano), en el flanco de la pata del animal. El grupo de animales CFA (control) recibió todo lo anterior exceptuando MOG₃₅₋₅₅. Una vez finalizada la inmunización, se inyectó intraperitonealmente la toxina pertúsica para amplificar la respuesta inmune (200 ng/100 µl de PBS por ratón). A las 48 horas post-inmunización se volvió a inyectar la toxina. Los animales CFA fueron inoculados con la misma emulsión que los demás grupos inmunizados, pero sin MOG, y no recibieron la toxina pertúsica.

1.1.2.1. Diseño experimental

El tratamiento comenzó a día 7 post-immunización (dpI), al percibir los primeros síntomas clínicos motores de la enfermedad, y tuvo una duración de 21 días, hasta el día de sacrificio (28 dpI, Figura 14). Los ratones recibieron el tratamiento mediante inyecciones intraperitoneales diarias del compuesto VCE-003 (5 mg/kg), VCE-003.2 (10 mg/kg), VCE-004.8 (10 mg/kg), VCE-006 (5 mg/kg) o vehículo (DMSO/PBS), según el grupo/experimento correspondiente. En los experimentos en los que se utilizaron antagonistas del receptor CB2 (AM630, 2 mg/kg en PBS) o del receptor PPARγ (T0070907, 5 mg/kg en PBS), los animales fueron tratados intraperitonealmente con los antagonistas 15 minutos antes que con VCE-003.

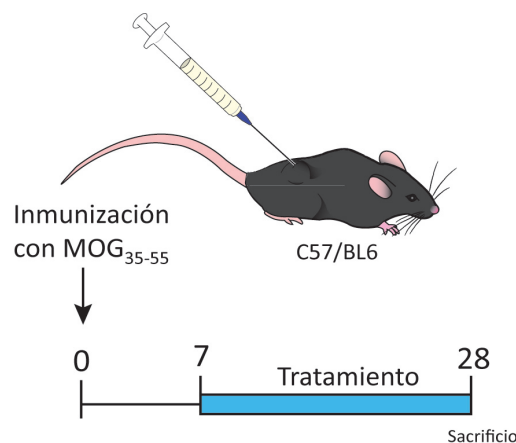


Figura 14. Esquema del desarrollo del experimento con el modelo de EAE.

1.1.2.2. Seguimiento clínico de la EAE

Se examinó diariamente los signos clínicos neurológicos de los ratones mediante una escala clínica que permitía la valoración de una parálisis creciente (Figura 15). Se otorgaron las siguientes puntuaciones:

- 0 - No evidencias clínicas neurológicas.
- 1 - Parálisis total de la cola.
- 2 - Paraparesia trasera leve.
- 3 - Parálisis total de una de las extremidades posteriores.
- 4 - Parálisis total de ambas extremidades posteriores.
- 5 - Muerte o criterio de punto final.

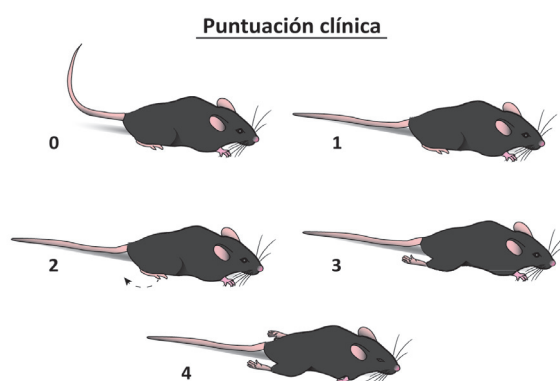


Figura 15. Imágenes representativas de los signos clínicos de los ratones.

1.2. Cultivos celulares

Para realizar los cultivos primarios de neuronas de ratón, se utilizaron embriones E17-E18 de la cepa CD1, cuyas madres fueron criadas en el Instituto Cajal (CSIC). Para los cultivos de microglía y progenitores de oligodendrocitos (OPCs, del inglés *oligodendrocyte progenitor cells*) se utilizaron ratas Wistar postnatales de 0 a 2 días de edad criadas en el animalario del Instituto Cajal (CSIC). También se utilizaron líneas celulares establecidas de fenotipo endotelial cerebral murino (bEnd5, European Collection of Cell Cultures, Reino Unido) y de fenotipo microglial murino (BV-2; Interlab Cell Line Collection, Génova), así como la línea celular neuronal PC-12, cedida por el Dr. Lorenzo Romero, del laboratorio del Prof. Manuel Nieto-Sampedro (Instituto Cajal, CSIC). Asimismo, se utilizó la línea neuronal HT22, procedente del laboratorio del Prof. Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba).

Además, se utilizaron cultivos de células de diferentes líneas establecidas utilizadas para transfección: C6.9 (glioma), HEK293 (riñón), N2A (neuroblastoma), MO3.13 (oligodendroglial), SK-N-SH (neuroblastoma) y PC-12 (feocromocitoma de médula adrenal), también procedentes del laboratorio del Prof. Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba).

1.2.1. Cultivos primarios de neuronas

Los cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral se obtuvieron de embriones E17-E18 de ratones hembra de la cepa CD1, siguiendo el protocolo descrito (Rose y cols., 1993). Primero, se extrajeron los embriones y fueron decapitados inmediatamente, colocando las cabezas en una placa de Petri (60 mm) con medio HBSS sin magnesio ni calcio. Se procedió a retirar la piel y el cráneo de los embriones, y se extrajo el cerebro. Se eliminaron los bulbos olfativos, y tras diseccionar y apartar las meninges, el tronco encefálico y el hipocampo, se colocaron las cortezas de ambos hemisferios cerebrales en una placa de Petri (60 mm) con 1 ml de medio HBSS, y se fragmentaron con bisturí. El paso siguiente consistió en someter al tejido a una disgregación enzimática con DNAsa I (1 mg/ml) y tripsina al 2,5% sin EDTA en HBSS, durante 15 minutos a 37°C (agitando cada 5 minutos). Después de este tiempo, el homogeneizado precipitó, y para lavar la DNAsa y la tripsina, se aspiró con cuidado el sobrenadante, se añadió 6 ml de HBSS, se resuspendió y se dejó que decantara el homogeneizado durante 3 minutos, repitiéndose este proceso dos veces más. El tejido se sometió, para un homogeneizado mayor, a una disgregación mecánica con 2 pipetas Pasteur de diferentes diámetros (previamente flameadas para obtener dichos diámetros) lavadas con suero de caballo para evitar la adherencia de las células, realizando 10 pases por pipeta.

Posteriormente, se procedió a contar y plaquear las células. Para ello, se utilizaron placas de 12 y 24 pocillos tratados desde el día anterior con poli-D-lisina (5 µg/ml) y lavados 2 veces con agua destilada. Dependiendo del experimento, se sembraron 5×10^5 ó $2,5 \times 10^5$ por pocillo en medio DMEM con 10% de suero de caballo (HS, del inglés *horse serum*). A las 3 horas se reemplazó el medio de cultivo por medio Neurobasal, enriquecido con B-27 (2%), GlutaMAX 2 mM y 0,5% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Las células se incubaron durante 3 días en condiciones controladas de humedad, a 37°C de temperatura y 5% de CO₂. Tras este periodo de tiempo, se añadió al cultivo citosina-D-arabinofuranósido (AraC) 10 µM para detener la división celular. Se cambió el medio a los 5 días, y las células se trataron 9 días después de ser plaqueadas. La pureza del cultivo, determinada mediante inmunohistoquímica, fue mayor del 95%.

1.2.2. Cultivo primario mixto

Los cultivos primarios mixtos fueron preparados a partir de encéfalos de ratas P0-P2, desechando los bulbos olfativos y el tronco encefálico, siguiendo las modificaciones que Molina-Holgado y cols. (2002) y Mecha y cols. (2011; doi:10.1038/protex.2011.218) realizaron del protocolo de McCarthy y de Vellis (1980).

Una vez extraído, el encéfalo se colocó en DMEM frío, y se retiraron las meninges y vasos

sanguíneos asociados a ellas. Los encéfalos fueron disgregados mecánicamente con una pipeta Pasteur previamente recubierta con suero, filtrado con una malla de 150 μm de tamaño de poro y las células resultantes fueron resuspendidas en DMEM con 10% de HS, 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) y 1% de penicilina/estreptomicina (DMEM 10:10:1), y sembradas en tubos Falcon de 75 cm^2 (previamente cubiertos con poli-D-lisina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los tubos Falcon se incubaron a 37°C en condiciones controladas de humedad y 5% de CO_2 .

Después de transcurrir 7-10 días, se observó una estratificación de células. En el fondo de los tubos Falcon, una monocapa confluyente de astrocitos, sobre la que se situaban las células O2A (del inglés *Oligodendrocyte-type 2 astrocyte*), adheridas a los astrocitos. Estas células O2A pueden diferenciarse a oligodendrocitos o a astrocitos tipo 2, dependiendo del medio de cultivo. Las células microgliales poseen una adherencia débil a la monocapa de astrocitos y también puede estar en suspensión en el medio de cultivo.

1.2.2.1. Cultivo primario de microglía a partir de un cultivo mixto de encéfalo de rata

Como se ha comentado anteriormente, las células se cultivaron durante 7-10 días. A continuación, los tubos Falcon fueron agitados a 230 rpm durante 3 horas a 37°C para separar las células microgliales. Finalmente, se recogió el sobrenadante, que contenía las células, se centrifugaron y se sembraron 5 x 10⁴ células/ cm^2 para los ensayos correspondientes. La pureza del cultivo, determinada mediante inmunohistoquímica, fue mayor del 95% (Mecha y cols., 2011).

1.2.2.2. Cultivo primario de OPCs a partir de un cultivo mixto de encéfalo de rata

Los cultivos primarios de OPCs se realizaron a partir de cultivos mixtos de ratas Wistar. Una vez aspirado el medio con las células microgliales, se repuso el medio de cultivo DMEM 10:10:1, y los tubos Falcon fueron agitados de nuevo a 260 rpm durante 18 horas a 37°C, para separar las células O2A del cultivo. La suspensión obtenida fue filtrada por una malla de nylon de 30 μm y transferida a placas Petri no tratadas. Después se incubó durante 1 hora a 37°C con el objetivo de purificar al máximo los OPCs, dada su poca adherencia al plástico, al contrario que las células microgliales o astrogiales. A continuación, las células O2A fueron resuspendidas en DMEM 10:10:1 y plaqueadas a una densidad de 50.000 células/ cm^2 en placas multipocillo recubiertas con poli-D-lisina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), donde se mantuvieron durante 3 horas hasta que el medio fue cambiado a medio específico sin suero (SFM) que contenía factores de crecimiento (5 ng/ml de bFGF y PDGF-AA). El medio SFM consiste en DMEM/F12 complementado con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrina,

10 nM biotina, 30 nM selenito sódico, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ putrescina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulina, 20 nM hidrocortisona, 20 nM progesterona, 1% penicilina/estreptomicina. Las células permanecieron en una fase inicial de proliferación de 3 días, tras los cuales se cambió el medio de cultivo a un medio SFM sin factores de crecimiento y con 30 nM triyodotironina durante 5 días, para inducir su maduración. La pureza del cultivo, determinada mediante inmunohistoquímica, fue mayor del 95% (Mecha y cols., 2011).

1.2.3. Cultivo de línea celular de células microgliales BV-2

Para cada experimento, tras alcanzar una confluencia del 80%, las células se plaquearon en placas de doce pocillos (5×10^5 células/ml), en DMEM suplementado con un 10% de FBS, 10% de HS y un 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), y mantenidas en unas condiciones de humedad, temperatura de 37°C y un 5% de CO_2 . Los tratamientos fueron administrados 24 horas después de plaquear las células.

1.2.4. Cultivo de línea celular de células endoteliales cerebrales murinas (bEnd5)

Esta línea celular se obtuvo de la colección europea de líneas celulares (European Collection of Cell Cultures; Reino Unido). Las células se plaquearon en placas de doce pocillos (5×10^5 células/ml) o en placas de seis pocillos ($2,5 \times 10^5$ células/ml), en DMEM suplementado con un 10% de FBS inactivado y un 1% de penicilina/estreptomicina, y mantenidas en unas condiciones estándar de humedad, temperatura de 37°C y un 5% de CO_2 . Los tratamientos se administraron 24 horas después de plaquear las células.

1.2.5. Cultivo de línea celular PC-12

Se procedió a plaquear 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en DMEM suplementado con un 10% de FBS inactivado y un 1% de penicilina/estreptomicina, y mantenidas en unas condiciones estándar de humedad, temperatura de 37°C y un 5% de CO_2 . Después de 24 horas, las células fueron estimuladas según el experimento correspondiente, y la viabilidad celular se comprobó 24 horas después de tratar las células (apartado 1.3).

1.2.6. Cultivo de las líneas celulares C6.9, HEK293, N2A, MO3.13, SK-N-SH, HT22 y PC-12

Las líneas celulares se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS inactivado y 0,5% de penicilina/estreptomicina, y fueron plaqueadas a una densidad de 10^5 células/ml. Los cultivos se mantuvieron en unas condiciones estándar de humedad, temperatura de 37°C y un 5% de CO₂. Las transfecciones se realizaron 24 horas después de plaquear las células.

1.3. Determinación de la viabilidad celular

- *Liberación de LDH*: La muerte celular se valoró cuantificando de manera indirecta la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo, utilizando un kit comercial. Como control de muerte neuronal, se lisaron las células de un pocillo control con 2% Tritón X-100. Tras finalizar el tiempo del tratamiento, se recogieron 100 µl por pocillo de los sobrenadantes, que se depositaron en una placa de 96 pocillos. A cada uno de los pocillos se les añadió 100 µl de la mezcla del kit y se incubó la placa 30 minutos, en oscuridad y a 37°C. A continuación, se midió la absorbancia a 492 nm en el Multiskan y, dependiendo del experimento, se consideró como 100% la muerte basal del cultivo, o bien la muerte inducida por el estímulo de A23187/glutamato.

- *MTT*: Tras realizar los tratamientos, las células se incubaron durante 3 horas a 37°C y en oscuridad con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, concentración final de 0,5 µg/ml) precalentado previamente a 37°C. Una vez finalizada la incubación, se añadieron 200 µl de DMSO en cada pocillo. A continuación, se obtuvieron 100 µl y se depositaron en una placa de 96 pocillos. Por último se midió la absorbancia a 595 nm, y los datos resultantes se refirieron a la supervivencia basal del cultivo como 100%.

1.4. Transfección transitoria con plásmido reportero

Las células de las diferentes líneas establecidas (C6.9, HEK293, N2A, MO3.13, SK-N-SH y PC-12) se plaquearon a una densidad de 10^5 células/ml en medio DMEM con FBS y sin antibióticos. A las 24 horas, se retiró el medio y se añadieron gota a gota 60 µl de la mezcla de transfección, formada por el plásmido reportero ARE-Luc y Roti-Fect en DMEM sin suero. Después de 5 horas, se realizó un cambio de medio a DMEM con FBS, y a las 24 horas las células se trataron con los diferentes compuestos sometidos a estudio (CBG o VCE-003, 10 µM) durante 6 horas. La actividad luciferasa se cuantificó mediante *Dual-Luciferase Assay* y la transactivación se expresó como el número de veces sobre las células sin tratar.

1.5. Técnica de inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western blot)

Para la extracción de proteínas, las células se despegaron de las placas de cultivos con 30 μ l de tampón de lisis e inhibidores de proteasas, se pasaron a un tubo Eppendorf, y tras sonicar las muestras, se centrifugaron durante 15 minutos a 13.500 rpm a 4°C para obtener el extracto de proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó mediante la reacción de Bradford. Posteriormente, a cada muestra se le añadió tampón de muestras Laemli 5X y fueron hervidas durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Del resultado anterior, 30 ó 40 μ g de proteína se corrieron en geles de electroforesis con 10% de acrilamida, y a continuación se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (90 V durante 70 minutos). Posteriormente, se sometieron a las membranas a 95°C en tampón citrato de pH 6, para incrementar la exposición de epítomos.

Después de todo este proceso, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos cada vez con TBS (solución de Tris Base 25 mM y NaCl 137 mM), y a continuación se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST (TBS + Tween-20 al 10%). Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas con tampón de bloqueo [contiene 5% de leche desnatada, si la proteína de estudio no estaba fosforilada; o 5% de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*), si la proteína sí estaba fosforilada] durante 1-2 horas. A continuación, se incubaron las membranas durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Tras realizar 3 lavados durante 10 minutos con TBST, se procedió a la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano y diluido en tampón de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas y la inmunodetección de las proteínas de estudio se realizó mediante revelado por quimioluminiscencia (con una solución de luminol y ácido p-cumárico). Las membranas que iban a ser reutilizadas con otros anticuerpos fueron sometidas a un proceso de stripping leve con un tampón de pH 6,8 que contenía glicina, SDS, Tween-20 y agua destilada. Por último, la señal se cuantificó por densitometría mediante un escáner GS-800 de BioRad.

1.6. Enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA)

Para la determinación de la porción soluble de la molécula VCAM-1 (sVCAM-1), se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos de células bEnd5 después de los distintos tratamientos y se congelaron hasta el momento del ensayo a -80°C. Se utilizó el kit comercial de detección de sVCAM-1 (R&D Systems; Minneapolis, MN, EEUU), siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante. En primer lugar, se añadió 50 μ l del diluyente RD1-21 y a continuación 50 μ l de cada muestra y de las diluciones para realizar la curva estándar. Se agitó 1 minuto suavemente, y después se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se aspiró y lavó cada

pocillo, repitiendo el proceso 4 veces con solución de lavado (400 μ l). A continuación, se añadió a cada pocillo 100 μ l de conjugado de sVCAM-1 de ratón, y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se repitieron los 4 aspirados/lavados, y se añadieron 100 μ l de solución sustrato a cada pocillo, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se añadieron 100 μ l de solución para detener la reacción, y se agitó suavemente. Para finalizar, después de esperar unos minutos, se procedió a obtener las mediciones de densidad óptica de cada pocillo a una absorbancia de 450 nm. La sensibilidad del kit de sVCAM-1 es de 20 pg/ml, y los coeficientes de variabilidad (CV) intra-ensayo e inter-ensayo fueron 4,6% y 6,8%, respectivamente.

Para la cuantificación de PGE₂, se utilizó un kit de ELISA para PGE₂ (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se añadió 100 μ l de la solución ELISA a los pocillos NSB, y 50 μ l de solución ELISA a los pocillos B0. Se realizó una curva estándar y se añadió 50 μ l de muestra por pocillo. A continuación, se añadió 50 μ l del anticuerpo, y se incubó la placa en oscuridad durante 18 horas a 4°C. Una vez finalizado, se lavaron los pocillos con solución de lavado, se añadió 200 μ l el reactivo de Ellman por pocillo y se dejó incubando durante 1 hora en oscuridad. Para finalizar, se procedió a obtener las mediciones de densidad óptica de cada pocillo a una absorbancia de 420 nm. La sensibilidad del kit de PGE₂ es de 15 pg/ml, con un CV intra-ensayo de 6,6% y CV inter-ensayo de 15,5%.

Para la determinación de la concentración de IL-1 β , IL-6, TNF α y CCL3, se recogieron los sobrenadantes procedentes de cultivos primarios de microglía con sus correspondientes tratamientos, y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A continuación se determinaron mediante la técnica de Bio-Plex (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se analizaron con el sistema Bio-Plex™ 200 y se cuantificó mediante el software Bio-Plex Manager. La sensibilidad de este kit es de 2-12 pg/ml, con un CV intra-ensayo de 4% y un CV inter-ensayo de 2-7%.

1.7. Determinación de nitritos

Para determinar la concentración de nitritos en los sobrenadantes de cultivos de células BV-2 se siguió el protocolo de Schmidt y cols. (1992). Un volumen de 50 μ l de los sobrenadantes con los distintos tratamientos se pipeteó en una placa de 96 pocillos, y se dejó atemperar 10 minutos en oscuridad, tras lo cual se procedió a añadir 50 μ l del reactivo de Griess a cada pocillo. Después de 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 540 nm. Los datos se relativizaron a la curva estándar correspondiente.

1.8. Estudios de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)

1.8.1. Extracción del ARNm

Para los análisis de expresión génica *in vivo* se utilizó la sección cervical de las médulas espinales. El tejido se homogeneizó con QIAzol (QIAgen, Reino Unido), y el ARN se extrajo utilizando el kit de columnas RNeasy (QIAgen, Reino Unido), eliminando la posible contaminación de ADN degradado con el tratamiento con DNaseI (QIAgen, Reino Unido). La concentración de ARN y su pureza se obtuvo por las medidas de A260/A280 realizadas con un espectrofotómetro Nanodrop® (Nanodrop Technologies, EEUU).

1.8.2. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se usó 1 µg de ARN total, que fue retrotranscrito a ADNc mediante el kit de Transcripción Reversa de Promega (Promega, España) y utilizando secuencias poly-dT. Las secuencias de los cebadores (*primers*) se detallan en la Tabla 1. La expresión de los genes de estudio por PCR en tiempo real fue cuantificada usando SYBR Green (Applied Biosystems, Reino Unido), utilizando 1 µl de ADNc y con los primers en una concentración final de 200 nM. Las condiciones de los ciclos de la PCR consistieron en un paso inicial de activación a 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos seguidos de periodos de alineamiento y extensión a 60°C durante 1 minuto. Estos ensayos de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos utilizando el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Reino Unido). Cada muestra se analizó en triplicado y se utilizó el gen 18S como control interno. Los resultados se muestran como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

En algunos experimentos, la retrotranscripción de 1µg de ARN a ADNc se realizó mediante el kit de transcripción iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio Rad; Hercules, CA, EEUU). El ADNc generado se analizó por PCR a tiempo real, usando el mix iQ™ SYBR Green Supermix (Bio Rad; Hercules, CA, EEUU), con el sistema de detección CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio Rad; Hercules, CA, EEUU). Cada muestra se analizó por triplicado y se utilizó el gen GAPDH como control interno. Los resultados se muestran como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

	Sentido	Antisentido
IL-1β	5'-CTC CAC CTC AAT GGA CAG AA-3'	5'-TCC AGG TAG CTA TGG TAC TCC-3'
TNFα	5'-AGA GGC ACT CCC CCA AAA GA-3'	5'-CGA TCA CCC CGA AGT TCC CAT T-3'
IFNγ	5'-CTC AAG TGG CAT AGA TGT GGA AG-3'	5'-GCT GGA CCT GTG GGT TGT TGA-3'
IL-17	5'-CCT CAG ACT ACC TCA ACC GTT C-3'	5'-TTC ATG TGG TGG TCC AGC TTT C-3'
iNOS	5'-AAC GGA GAA CGT TGG ATT TG-3'	5'-CAG CAC AAG GGG TTT TCT TC-3'
ICAM-1	5'-CAG ATG CCG ACC CAG GAG AG-3'	5'-ACA GAC TTC ACC ACC CCG ATG-3'
18S	5'-ATG CTC TTA GCT GAG TGT CCC G-3'	5'-ATT CCT AGC TGC GGT ATC CAG G-3'
GAPDH	5'-TGG CAA AGT GGA GAT TGT TGC C-3'	5'-AAG ATG GTG ATG GGC TTC CCG-3'

Tabla 1. Cebadores (*primers*) utilizados para RT-PCR.

1.9. Análisis histopatológico

1.9.1. Procesado del tejido

Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg). Se perfundieron transcardíacamente con salino, y a continuación, se extrajeron las médulas espinales por extrusión y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS 0,1 M durante toda la noche. Posteriormente, se crioprotegieron con soluciones crecientes de sacarosa (15% y 30%) diluida en PBS 0,1 M y se congelaron a -80°C hasta su utilización. Para obtener los cortes, el tejido fue embebido en Tissue-Tek® y cortado en criostato a 15-30 µm de grosor. Finalmente, los cortes obtenidos se almacenaron a 4°C en una solución de PB + azida sódica 0,2%, o a -20°C en una solución crioprotectora que incluye polivinilpirrolidona 40 (PVP-40), sacarosa, polietilenglicol 400 y PB, hasta su utilización.

1.9.2. Inmunohistoquímica

1.9.2.1. Marcaje con inmunofluorescencia

Las secciones torácicas de las médulas espinales (30 µm de grosor) en flotación se lavaron 3 veces durante 10 minutos, con PB 0,1 M. Se permeabilizó el tejido con 3 lavados de 10 minutos con PBT (PB 0,1 M + 0,1% Tritón X-100). Para evitar uniones inespecíficas, se bloquearon con PBT + 5% de suero animal, y se incubaron con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras dicha incubación, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBT, y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente. Una vez finalizado este paso, se procedió a lavar 3 veces durante 10 minutos con PB 0,1 M y se incubaron con DAPI (1:1.000) durante 10 minutos. Para finalizar, los cortes fueron montados sobre portaobjetos con una solución 1:1 de glicerol y PB 0,1 M, o Mowiol.

1.9.2.2. Marcaje con diaminobenzidina (DAB)

Las secciones torácicas en flotación de las médulas espinales (30 µm) se lavaron 3 veces durante 10 minutos, con PB 0,1 M. A continuación, se procedió con la inhibición de la peroxidasa endógena durante 1 hora con una solución de 50% metanol y 1,66% H₂O₂ en PB 0,1 M, a temperatura ambiente y en oscuridad. Se permeabilizó el tejido con 3 lavados de 10 minutos con PBT, y posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas con el tampón de bloqueo (PBT + 5% de suero animal). Una vez finalizado este paso, se incubaron con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras dicha incubación, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBT para eliminar el exceso de anticuerpo primario,

y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a biotina y diluido en tampón de bloqueo. A continuación, se procedió a lavar 3 veces durante 10 minutos con PBT, y a incubar el tejido con avidina-peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Se repitieron los 3 lavados de 10 minutos cada uno con PB 0,1 M y se procedió con el revelado con DAB (diaminobenzidina al 0,025% y H₂O₂ al 0,003% en PB). Se lavaron las secciones 3 veces durante 10 minutos con PB 0,1 M y se montó el tejido sobre portaobjetos gelatinizados al 2%. Una vez secados a temperatura ambiente, se tiñeron los cortes con azul de toluidina durante 12 minutos. Tras este paso, se realizó un lavado con agua y se procedió con la deshidratación del tejido, sometiénolo a pases de alcohol crecientes (70%, 96%, 100% por duplicado) y por xileno (por duplicado), durante 10 minutos por solución. Finalmente, se cubrieron los cortes de los portaobjetos con DePeX[®] y se colocó el cubreobjetos.

1.9.2.3. Marcaje de hematoxilina-eosina (H/E)

Para las tinciones de H/E, se montaron las secciones de 30 µm de grosor en portaobjetos (previamente gelatinizados al 2%), y se dejaron secar toda la noche. A continuación, se sumergieron los portaobjetos en hematoxilina durante 3 minutos. Una vez pasado este tiempo, se realizó un lavado con agua para eliminar el exceso de hematoxilina, y se sumergieron los portaobjetos en eosina al 1% durante 1,5 minutos. Al igual que antes, se procedió a lavar con agua destilada durante 30 segundos. Una vez teñidos los cortes, y para deshidratarlos, sometimos a los portaobjetos a pases en un gradiente creciente de alcoholes: 70%, 96%, 100% (2 veces) y xileno (2 veces), durante 10 minutos cada uno. Finalmente, se cubrieron con DePeX[®] y los cubreobjetos y se dejaron secar.

1.9.2.4. Marcaje de Nissl

Las secciones torácico-lumbares de médula espinal de 30 µm de grosor fueron teñidas con la solución de Nissl (alumbre de cromo) a 50°C durante 10 minutos, y a continuación se deshidrataron con etanol al 100%, se clarearon con xileno, se montaron con DePeX[®] y se colocaron los cubreobjetos, dejándolos secar.

1.9.2.5. Marcaje de *Luxol Fast Blue* (LFB)

Las secciones torácico-lumbares en flotación de las médulas espinales (15 µm de grosor) se lavaron tres veces durante 10 minutos. Las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol, de 70% a 95%, y se incubaron en la solución de LFB durante una noche a 56°C. Al día siguiente, el exceso de tinción se eliminó utilizando etanol al 95%, y las secciones se

diferenciaron en una solución de carbonato de litio durante 30 segundos. Las secciones se deshidrataron, se aclararon con xileno y se montaron con DePeX® y se colocaron los cubreobjetos.

1.9.2.6. Marcaje de mielina con el kit Hito CryoMyelinStain™

Los cortes se montaron sobre portaobjetos gelatinizados al 2% y se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente, se procedió a lavar los portaobjetos 3 veces durante 5 minutos cada vez con agua MiliQ. Después, se cubrieron los cortes con la mezcla de la solución 2 (20%) y la solución 3 (80%) del kit dentro de una cámara húmeda, y se introdujo ésta en una estufa a 37°C durante 4 horas. Tras este tiempo, se realizaron 3 lavados rápidos con agua MiliQ y los cortes fueron cubiertos con la solución indicada en el kit durante 3 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron los portaobjetos con agua MiliQ y se comenzó la deshidratación de los cortes con el gradiente creciente de alcoholes ya explicado anteriormente, se aclararon las secciones con xileno y se montaron con DePeX®. Finalmente, se colocaron los cubreobjetos y se dejaron secar.

1.9.3. Evaluación de la infiltración celular

Se cuantificó la cantidad de infiltrados celulares en médula espinal mediante la tinción con H/E o tinción de Nissl. El criterio de cuantificación de la infiltración seguido fue el siguiente (Figura 16):

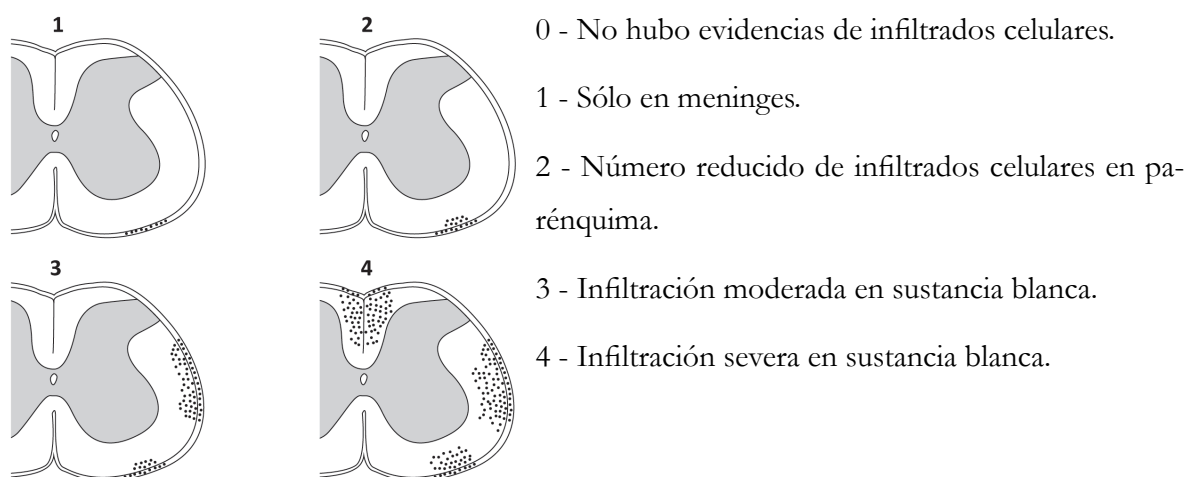


Figura 16. Esquema del criterio de evaluación utilizado para determinar el grado de infiltración celular.

1.10. Microscopía óptica y confocal

1.10.1. Microscopía óptica y análisis de imagen

Para la adquisición de las imágenes de tinciones con DAB se utilizó un microscopio Zeiss al que se encontraba acoplado un sistema de captura de imágenes Nikon de alta resolución. Para el análisis, se utilizaron seis secciones de médula espinal torácica-lumbar de 4-6 animales por grupo. Para la cuantificación del marcaje se usó el software de análisis de imagen ImageJ (NIH; Bethesda, MD, EEUU), manteniendo el mismo umbral de intensidad para todas las imágenes del mismo experimento. El resultado se expresa como porcentaje del área total marcada.

1.10.2. Microscopía confocal y análisis de imagen

En el caso de las imágenes obtenidas de tinciones con fluorescencia, se analizaron seis secciones de médula espinal torácica-lumbar por animal, de 4-6 ratones por grupo experimental. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS SP5. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada con el software de análisis de imagen ImageJ (NIH; Bethesda, MD, EEUU), manteniendo el mismo umbral de intensidad para todas las imágenes del mismo experimento.

1.11. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc-IBM; Chicago, IL, EEUU). Los datos referentes a la puntuación clínica en el modelo de EAE están representados como la media aritmética \pm desviación estándar de la media (DEM) o como la media aritmética \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard error of the mean*). Para hacer comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba paramétrica *t* de Student, y si la comparación era de más de dos grupos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con las pruebas *a posteriori* de Bonferroni o Tuckey. En aquellos casos en los que la prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) fue significativa, se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de una comparación por parejas con el test de U de Mann-Whitney. Los valores con una $p < 0,05$ se consideraron como significativos, los que tenían una $p < 0,01$ se valoraron como muy significativos, y altamente significativos cuando $p < 0,001$.

2. MATERIAL

2.1. Reactivos

2.1.1. Cultivos celulares

- Albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Apo-transferrina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Azul Tripán (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Citosina arabinosida (AraC; Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- D-Biotina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Dihidrocloreuro de putrescina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- DMEM/F12 (Lonza Ibérica S.A.; Barcelona, España).
- DNAsa I (Roche Diagnostics, S.L.; Mannheim, Alemania).
- Dulbecco's modified Eagle's Media (DMEM, Lonza Ibérica S.A.; Barcelona, España).
- FGF básica (bFGF, Peprotech; Londres, Reino Unido).
- GlutaMAX (Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Hidrocortisona (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Insulina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- PDFG-AA humana (Peprotech; Londres, Reino Unido).
- Penicilina/Estreptomicina (Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Poli-D-Lisina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Progesterona (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Selenito sódico (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Suero fetal bovino (FBS, Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Suero fetal de ternero (FCS, Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Suero de caballo (HS, Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Suplemento B-27 (Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Tampón fosfato salino (PBS, Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Tripsina (Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).
- Tripsina-EDTA (Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España).

2.1.2. Procesamiento del tejido

- Paraformaldehído (PFA, Merck; Darmstadt, Alemania).
- Sacarosa (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Tissue-Tek® (Sakura; Zoeterwoude, Holanda).

2.1.3. Inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y otras tinciones

- 3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Alumbre de cromo (Panreac Química S.A.U.; Barcelona, España).
- Carbonato de litio (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Complejo avidina-biotina peroxidasa (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, EEUU).
- DePeX® (AMS Biotechnology; Oxon, Reino Unido).
- Etanol (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Mowiol (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Suero normal de cabra (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, EEUU).
- Suero normal de caballo (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, EEUU).
- Suero normal de conejo (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, EEUU).
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Xileno (Merck; Darmstadt, Alemania).

2.1.4. Marcadores

	Anticuerpo (Western blot)	Huésped	Distribuidor	Dilución de trabajo
Anticuerpos primarios	IκBα	Conejo	Cell Signaling Technologies	1:1.000
	ⓈIκBα	Conejo	Cell Signaling Technologies	1:1.000
	MBP	Ratón	Millipore	1:1.000
	MAG	Conejo	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:500
	α-Tubulina	Ratón	Sigma-Aldrich Química, S.A.	1:20.000
	iNOS	Ratón	BD Transduction Laboratories	1:1.000
Anticuerpos secundarios	Anti conejo-HRP	Burro	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	1:2.000
				1:4.000
	Anti ratón-HRP	Cabra	BioRad	1:8.000

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para Western blot.

	Anticuerpos (IHQ o ICQ) / Marcadores	Huésped	Distribuidor	Dilución de trabajo
Anticuerpos primarios	Iba1	Conejo	Wako Chemical Pure Industry	1:1.000
	CD4	Rata	BD Pharmingen	1:500
	CD8	Rata	BD Pharmingen	1:1.000
	VCAM-1	Cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:500
		Rata	BD Pharmingen	1:500
	Neurofilamento	Ratón	DSHB	1:1.000
	Neurofilamento H (cadena pesada)	Conejo	Millipore	1:1.000
	SMI32	Ratón	Covance	1:1.000
	RIP	Ratón	DSHB	1:1.000
	NFκB (p65)	Ratón	Rockland Immunochemicals Inc.	1:600
Anticuerpos secundarios	ZO-1	Conejo	Life Technologies	1:100
	Anti rata biotinilado	Conejo	Vector Laboratories	1:1.000
	Anti ratón biotinilado	Caballo	Vector Laboratories	1:1.000
	Anti cabra biotinilado	Conejo	Vector Laboratories	1:2.000
	Anti conejo biotinilado	Cabra	Vector Laboratories	1:1.000
	Alexa 488 Anti conejo	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
	Alexa 488 Anti rata	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
	Alexa 488 Anti ratón	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:2.000
	Alexa 594 Anti ratón	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
	Alexa 594 Anti cabra	Burro	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
Otros marcadores	Alexa 594 Anti conejo	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
	Azul de toluidina		Electron Microscopy Sciences	1:2.000
	DAPI		Roche Diagnostics, S.L.	1:1.000
	Hematoxilina		Sigma-Aldrich Química, S.A	
	Eosina		Panreac	
	Luxol Fast Blue (LFB)		BDH Laboratory supplies	
	Kit Hito CryoMyelinStain™		Hitobiotec Inc.	

Tabla 3. Anticuerpos y marcadores utilizados para teñir cortes histológicos. ICQ, inmunocitoquímica; IHQ, inmunohistoquímica.

2.1.5. Determinación de la viabilidad celular

- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Kit de detección de citotoxicidad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH; Roche Diagnostics, S.L.; Mannheim, Alemania).

2.1.6. Inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western blot)

- Ácido clorhídrico (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Ácido okadaico (Calbiochem; Darmstadt, Alemania).
- Ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Acrilamida al 30% (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Aprotinina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Benzamidina HCl (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Dodecil sulfato sódico (SDS; USB; Cleveland, OH, EEUU).
- Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF; Boehringer Mannheim; Mannheim, Alemania).
- Fluoruro sódico (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Hidróxido sódico (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Inhibidores de proteasas “Complete Mini” (Roche Diagnostics, S.L.; Mannheim, Alemania).
- Leche desnatada en polvo (Sveltesse, Nestlé; Barcelona, España).
- Leupeptina (Boehringer Mannheim; Mannheim, Alemania).
- Luminol (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Marcador de peso molecular de proteínas (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences Europe; Barcelona, España).
- Ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Persulfato amónico (BioRad; Hercules, CA, EEUU).- TEMED (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Tris base (Roche Diagnostics, S.L.; Mannheim, Alemania).
- Tween-20 (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).

2.1.7. Extracción de ARN, transcripción inversa (RT), reacción en cadena de la polimerasa y transfecciones

- Cloroformo (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Desoxirribonucleasa I (DNasa I; Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Ensayo de luciferasa (*Luciferase assay*, Promega Biotech Ibérica, S.L.; Madrid, España).
- Etanol (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Kit de extracción RNeasy® (QIAgen; Manchester, Reino Unido).
- Kit de transcripción iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio Rad; Hercules, CA, EEUU).
- Mix iQ™ SYBR Green Super mix (Bio Rad; Hercules, CA, EEUU).
- Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems; Warrington, Reino Unido).
- QIAzol® (QIAgen; Manchester, Reino Unido).
- Roti®-Fect (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Alemania).
- Sistema de transcripción inversa (Promega Biotech Ibérica, S.L.; Madrid, España).

2.1.8. Enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA)

- Kit para ratón Quantikine® ELISA sVCAM-1/CD106 (R&D Systems; Minneapolis, MN, EEUU).
- Kit para rata Prostaglandin E₂ ELISA (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, EEUU).
- Kit para rata Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine assay (BioRad; Hercules, CA, EEUU).

2.2. Compuestos

2.2.1. Compuestos utilizados en modelos de EM

- Adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories; Detroit, MI, EEUU).
- Cepa Daniel (DA) del virus de Theiler, cedido por el Dr. Moses Rodríguez (Departamento de Inmunología y Neurología de la Clínica Mayo; Rochester, NY, EEUU).
- MOG₃₅₋₅₅ (cedido por la Dra. Sara Ballester, ISCIII, Madrid, España/ Unidad de Desarrollo de Herramientas Proteicas, CNB, CSIC; Madrid, España/ ImmunoStep SL; Salamanca, España).
- *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories; Detroit, MI, EEUU).
- Toxina pertussis (procedente de *Bordetella pertussis*) (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).

2.2.2. Drogas y compuestos utilizados en los tratamientos

- A23187 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido).
- AM630 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido).
- CBG (cedido por Vivacell Biotechnology España; Córdoba, España).
- Dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- DMF (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- GW9662 (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- IFN γ murino (PeproTech Inc.; Rocky Hill, NJ, EEUU).
- IL-1 β murina (PeproTech Inc.; Rocky Hill, NJ, EEUU).
- Isoflurano (Esteve; Madrid, España).
- LPS derivado de *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Pentobarbital (Dolethal; Cedex, Francia).
- T0070907 (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, EEUU).
- TNF α murino (PeproTech Inc.; Rocky Hill, NJ, EEUU).
- VCE-003 (cedido por Vivacell Biotechnology España; Córdoba, España).
- VCE-003.2 (cedido por Vivacell Biotechnology España; Córdoba, España).
- VCE-004.8 (cedido por Vivacell Biotechnology España; Córdoba, España).
- VCE-006 (cedido por Vivacell Biotechnology España; Córdoba, España).

2.3. Instrumentos

- Actímetro (Activity Monitor System Omnitech Electronics, Inc.; Columbus, OH, EEUU).
- Bio-Plex™ 200 System, con el software Bio-PlexManager™ (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Campana de flujo laminar (Steril S.p.A.; Mazzo di Rho, Milán, Italia).
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen EBA 12; Tuttlingen, Alemania).
- Criostato (Leica Microsystems CM1950; Barcelona, España).
- Equipo para electroforesis (BioRad POWER-PAC300; Hercules, CA, EEUU).
- Escáner GS-800 (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Espectrofotómetro Nanodrop® (Nanodrop Technologies, EEUU).
- Incubador (RS Biotech Galaxy S; Escocia, Reino Unido).

- Microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, GMBH; Wetzlar, Alemania).
- Microscopio de fluorescencia invertido (Leica Microsystems, GMBH; Wetzlar, Alemania).
- Microscopio óptico (Olympus; Barcelona, España).
- Sistema de detección CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio Rad; Hercules, CA, EEUU).
- Sonicador (Sonics & Materials Inc. Vibra cell; Danbury, CT, EEUU).
- Termociclador (MJ Research PTC-100; Watertown, MA, EEUU).
- Termociclador cuantitativo a tiempo real 7500 (7500 Real Time PCR System; Applied Biosystems, Reino Unido).

IV. Resultados



1. Estudio del potencial terapéutico de nuevos derivados del cannabigerol: aproximación *in vitro* y con modelos de EM

La EM es una enfermedad que afecta al SNC y está caracterizada por pérdida de mielina y diferentes grados de pérdida axonal, que conlleva a una disfunción neurológica progresiva. La enfermedad se desarrolla con una fase inflamatoria inicial, seguida de una fase de desmielinización selectiva y, finalmente, una fase neurodegenerativa. La respuesta inmune contribuye a la formación y el mantenimiento de las lesiones en EM (Lassman y cols., 2001). Por consiguiente, el sistema inmune juega un papel crucial en la patogénesis de la EM, y resulta una buena diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.

Nuestro grupo tiene amplia experiencia en el abordaje de estudios sobre el potencial terapéutico del tratamiento con diferentes cannabinoides sintéticos, fitocannabinoides o de la modulación del sistema endocannabinoide en el modelo de TMEV-IDD (Mestre y cols., 2005; Docagne y cols., 2007; Loría y cols., 2008; Mestre y cols., 2009; Loría y cols., 2010; Mestre y cols., 2011; Mecha y cols., 2013b; Feliú y cols., 2015) y en el modelo de EAE (Hernández-Torres y cols., 2014; Moreno-Martet y cols., 2015).

En esta tesis doctoral se investigó las posibles dianas celulares y moleculares del derivado de CBG, VCE-003, y se valoró su potencial neuroprotector y antiinflamatorio, además de su influencia en la maduración de oligodendrocitos y su efecto sobre las moléculas de adhesión. Para ello, se realizaron cultivos de neuronas, microglía, oligodendrocitos o células endoteliales. Asimismo se investigó su capacidad terapéutica en dos modelos bien establecidos de EM, TMEV-IDD y EAE.

1.1. Perfil antiinflamatorio del CBG y de su derivado VCE-003 *in vitro*

En primer lugar, se estudiaron los efectos del CBG y del compuesto VCE-003 como posibles agentes antiinflamatorios en cultivos primarios de células microgliales de rata, en respuesta al estímulo inflamatorio LPS (500 ng/ml). Tras 18 horas de estimulación y tratamiento, se determinó la liberación de IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL3, y la prostaglandina E₂ (PGE₂), mediante la técnica de Bio-Plex y ELISA. Como se observa en la Figura 17, la estimulación con LPS indujo un aumento significativo en la secreción de estas moléculas ($p < 0,001$), que fue reducido con el tratamiento con CBG y VCE-003. El CBG inhibió de manera significativa y dosis-dependiente la liberación de IL-1 β ($p < 0,001$; Figura 17A), IL-6 ($p < 0,001$; Figura 17B), observando efectos significativos a la menor dosis utilizada. Sin embargo, TNF α y CCL3 necesitaron unas dosis de CBG de 25 μ M para inducir un descenso significativo en estas proteínas (TNF α : $p < 0,001$; CCL3: $p < 0,01$; Figura 17C y D, respectivamente). Cabe destacar que se necesitaron concentraciones menores de VCE-003 para inducir un descenso significativo en la producción de TNF α y CCL3. En cuanto a PGE₂, tanto el CBG como su derivado VCE-003, ejercieron el mismo efecto sobre la liberación de PGE₂ (10 μ M:

$p<0,05$; 25 μM : $p<0,01$; Figura 17E). VCE-003 disminuyó de manera más potente que el CBG la liberación de los mediadores proinflamatorios estudiados tras el estímulo inflamatorio con LPS.

Ya que la actividad de iNOS y la liberación de especies reactivas de nitrógeno aumentan durante procesos inflamatorios en el SNC (Smith y cols., 1999), pudiendo llegar a inducir muerte celular, se realizaron cultivos con la línea celular de microglía de ratón BV-2, se cuantificó el nivel de proteína iNOS en las células y se determinó la concentración de nitritos en los sobrenadantes como producto final de la actividad de iNOS (Figura 18). El estímulo inflamatorio inducido con LPS (50 ng/ml) e IFN γ (100 U/ml) indujo un aumento significativo de la proteína iNOS ($p<0,001$). El compuesto VCE-003 no indujo *per se* un aumento significativo de los niveles proteicos de iNOS en situación basal, y el pretratamiento con VCE-003 (1 μM) 15 minutos antes del estímulo inflamatorio redujo significativamente a niveles del control la cantidad de iNOS a las 24 horas ($p<0,01$; Figura 18). Ya que, como se ha comentado en el apartado de Introducción, el compuesto VCE-003

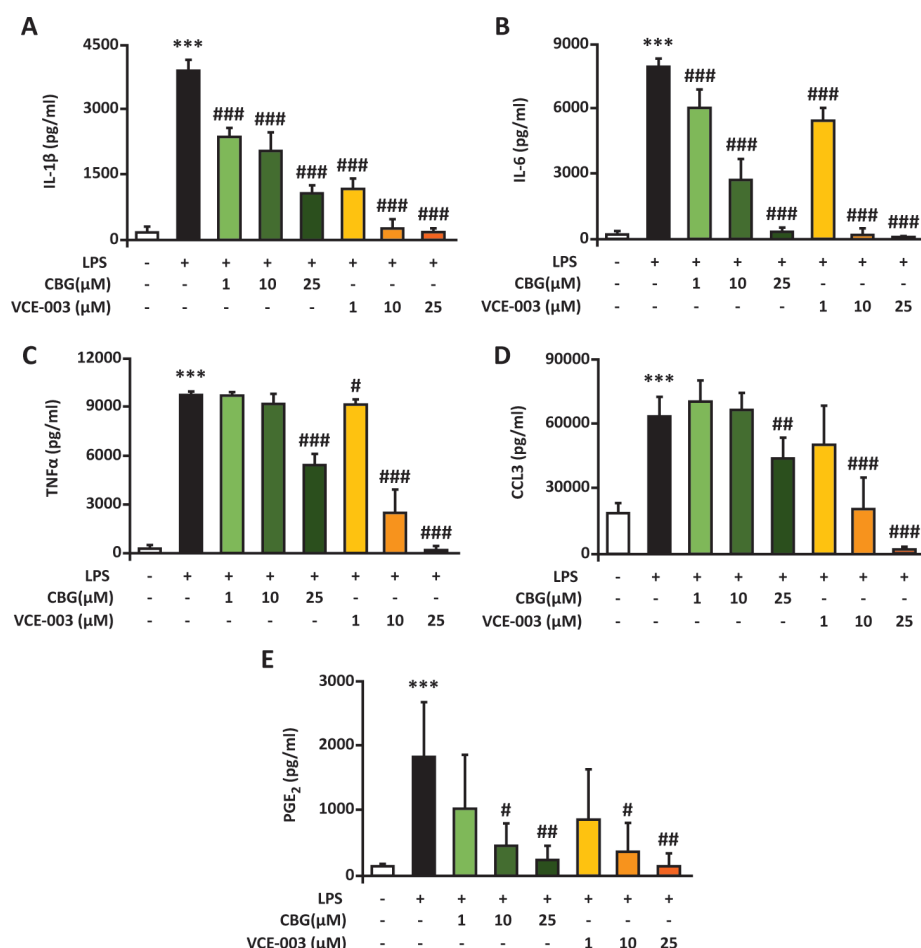


Figura 17. Efecto del CBG y VCE-003 en la secreción de mediadores proinflamatorios por células microgliales. Cultivos primarios de microglía de rata se incubaron con LPS durante 18 horas, en la presencia de las concentraciones indicadas de CBG o VCE-003. Los sobrenadantes fueron recogidos y se analizaron mediante un ensayo de Bio-Plex para detectar IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF α (C), CCL3 (D). El análisis de PGE $_2$ se realizó mediante la técnica de ELISA (E). Los datos se representan como la media \pm DEM (desviación estándar de la media) de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se usó el test *t*-Student *** $p<0,001$ vs CTL; # $p<0,05$ ## $p<0,01$ ### $p<0,001$ vs LPS.

posee afinidad por los receptores CB2 y PPAR γ (Granja y cols., 2012), se administraron 10 minutos antes que el VCE-003 los antagonistas AM630 (1 μ M) para el receptor CB2 y GW9662 (0,1 μ M) para el receptor PPAR γ . Ambos antagonistas revirtieron significativamente el efecto ejercido por el compuesto VCE-003 (AM630: $p<0,05$; GW9662: $p<0,01$) (Figura 18B), sugiriendo la participación de estos receptores en el efecto del compuesto VCE-003.

Seguidamente, se determinó la concentración de nitritos (NaNO₂) en los sobrenadantes de cultivos de células BV-2. El tratamiento con 1 μ M y 10 μ M de VCE-003 no aumentó los niveles de nitritos *per se* (Figura 18C). El estímulo inflamatorio con LPS (50 ng/ml) e IFN γ (100 U/ml) produjo un aumento en la concentración de nitritos en los sobrenadantes ($p<0,001$ respecto al control), en consonancia con la inducción de proteína iNOS observada anteriormente. Estos niveles se redujeron significativamente con VCE-003 (1 μ M: $p<0,05$) a las 24 horas (Figura 18C).

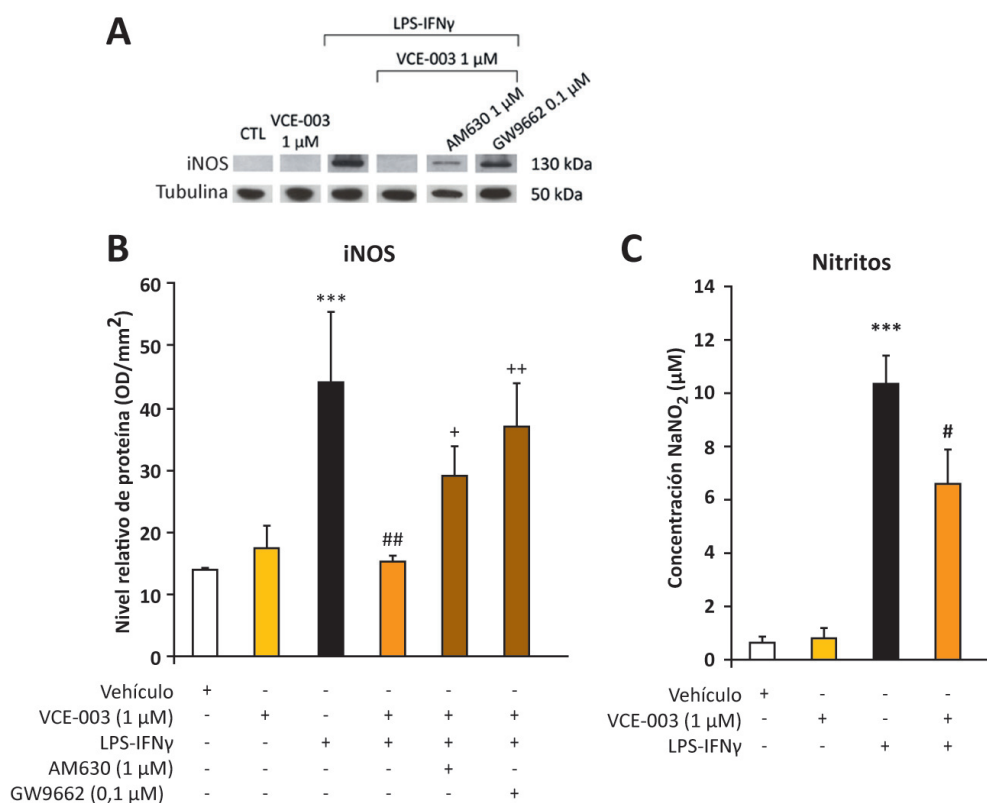


Figura 18. VCE-003 bloquea el incremento de iNOS inducido por un estímulo inflamatorio y disminuye la concentración de nitritos en el sobrenadante de células BV-2 a las 24 horas. Las células BV-2 fueron estimuladas con LPS e IFN γ , y pretratadas 15 minutos antes con VCE-003 (1 μ M). Los antagonistas de los receptores CB2 y PPAR γ (AM630, 1 μ M; GW9662 0,1 μ M, respectivamente) se administraron 10 minutos antes del tratamiento con VCE-003. Se utilizaron las proteínas procedentes de lisados de las células para su análisis mediante la técnica de Western blot. Los datos se presentan como el nivel relativo de proteínas, el cual se consiguió normalizando la señal de iNOS obtenida mediante densitometría con la señal de tubulina (A y B). El estímulo inflamatorio LPS-IFN γ indujo un aumento significativo de la concentración de nitritos en los sobrenadantes (C), y VCE-003 redujo estos niveles de manera significativa. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Para el análisis estadístico se usó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. *** $p<0,001$ vs Vehículo; # $p<0,05$ ## $p<0,01$ ### $p<0,001$ vs LPS-IFN γ ; + $p<0,05$ ++ $p<0,01$ vs LPS-IFN γ + VCE-003.

1.2. Estudio *in vitro* del perfil neuroprotector del CBG y de su derivado VCE-003

Como se ha mencionado en la Introducción, se ha descrito que los cannabinoides pueden ejercer un efecto neuroprotector en diferentes patologías. En consecuencia, se evaluó el papel neuroprotector del CBG y VCE-003 *in vitro*. Para ello, se realizaron cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral de ratón, que fueron expuestos al ionóforo de calcio A23187 (0,5 μ M) como control positivo (100%) de la muerte neuronal, medida por liberación de LDH al medio tras 24 horas de cultivo. Cuando las neuronas fueron pretratadas durante 15 minutos con diferentes concentraciones de CBG o VCE-003 (0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M), la muerte neuronal disminuyó significativamente a niveles del 50% ($p < 0,001$), sugiriendo que el CBG y VCE-003 ejercían un efecto neuroprotector en neuronas (Figura 19A).

Asimismo, se realizaron cultivos de la línea neuronal murina HT22 para corroborar dicho efecto neuroprotector. Las células fueron estimuladas con glutamato (15 mM), y pretratadas 15 minutos con concentraciones crecientes de CBG o VCE-003 (0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M). A las 24 horas, se determinó la supervivencia celular mediante un ensayo de MTT, y se observó un efecto neuroprotector significativo ejercido por CBG y VCE-003 a las concentraciones de 1 μ M y 10 μ M ($p < 0,001$).

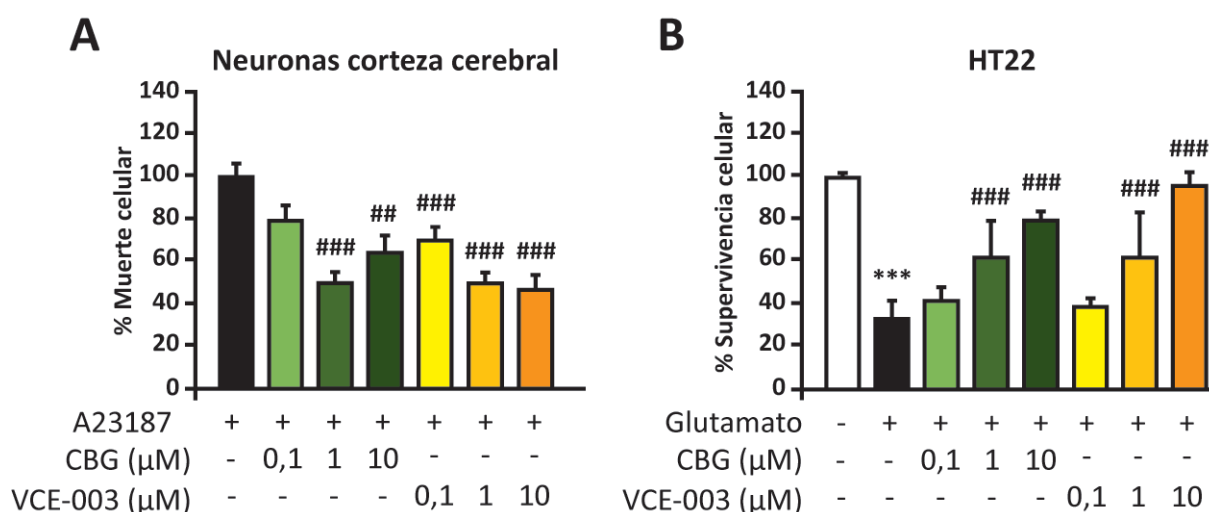


Figura 19. El pretratamiento con CBG o VCE-003 reduce significativamente la muerte neuronal inducida por el ionóforo de calcio A23187 (A) o glutamato (B) a las 24 horas. La muerte celular del cultivo primario de neuronas se determinó por liberación de LDH y se calculó como un porcentaje, tomando como 100% la muerte neuronal inducida por A23187 (A). La supervivencia celular en la línea establecida HT22 se determinó por MTT y se calculó relativizando como 100% la supervivencia basal del cultivo (B). Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado. Para determinar la significancia estadística, se utilizó el test paramétrico *t*-Student. (A) ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs A23187; (B) *** $p < 0,001$ vs CTL (-), ### $p < 0,001$ vs Glutamato.

1.3. Activación *in vitro* de la vía antioxidante de Nrf2 tras el tratamiento con el compuesto VCE-003.

La vía de Nrf2 (del inglés *Nuclear erythroid 2-related factor*) es el principal contribuyente en la respuesta antioxidante en respuesta a estrés oxidativo (Fujita y cols., 2012). Para investigar si en el efecto neuroprotector podían incidir las propiedades antioxidantes que poseen algunos fitocannabinoides, se estudió el efecto de la activación de la vía del factor Nrf2 en un experimento colaborativo con el grupo de inmunología de la Universidad de Córdoba, encabezado por el Prof. Eduardo Muñoz. Se transfectaron diferentes líneas celulares con el plásmido ARE-Luciferasa, y se trataron las células con CBG y VCE-003 (10 μ M) durante 6 horas. Tras el tratamiento con CBG, la actividad luciferasa asociada a la transcripción del gen *Nrf2* sólo se duplicó en la línea celular de neuroblastoma N2A ($p<0,01$; Figura 20). Sin embargo, el tratamiento con el compuesto VCE-003 activó esta señal en todas las líneas celulares de manera mucho más contundente, duplicando la señal luciferasa en las líneas PC-12 (neuronal, $p<0,001$) y MO3.13 (oligodendroglial, $p<0,001$); triplicando la señal en las líneas C6.9 (glioma, $p<0,01$), HEK293 (riñón, $p<0,001$) y SK-N-SH (neuroblastoma, $p<0,001$); y alcanzando una transcripción ocho veces superior al grupo control en la línea de neuroblastoma N2A ($p<0,001$).

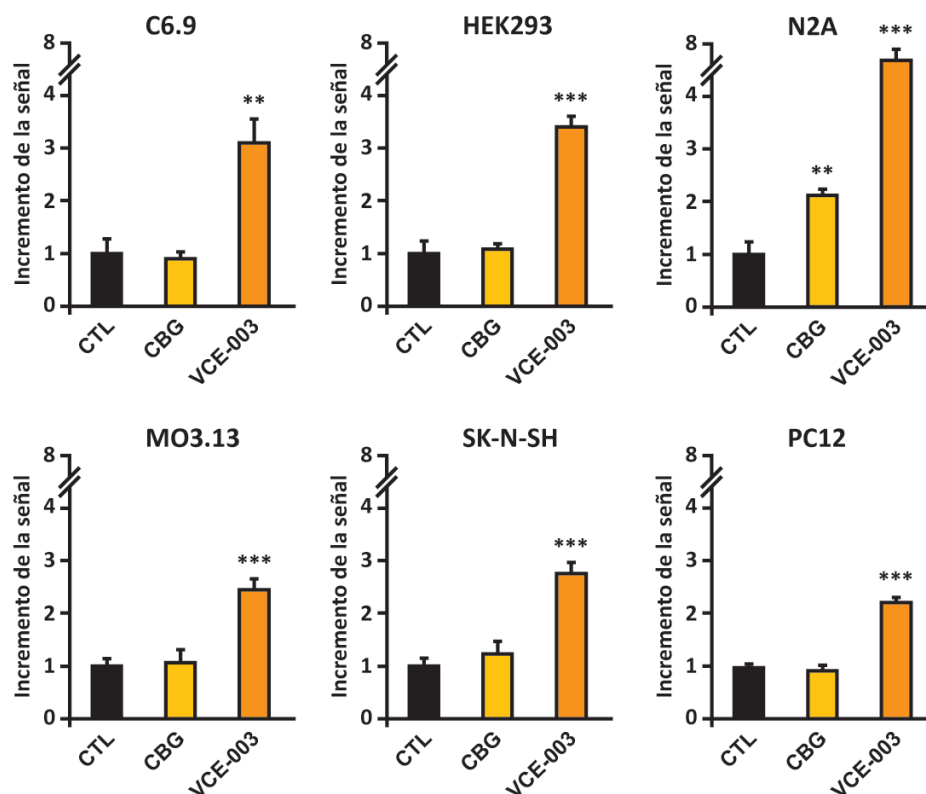


Figura 20. El tratamiento con VCE-003 induce la expresión de Nrf2 en diferentes líneas celulares. Las células se transfectaron con el plásmido ARE-Luc asociado al gen *Nrf2*, fueron estimuladas con CBG o VCE-003 (10 μ M) durante 6 horas, tras lo cual se determinó la actividad luciferasa. Los resultados se relativizaron a la señal de las células sin tratamiento, y los datos se presentan como la media \pm SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. Para el análisis estadístico se aplicó el test paramétrico de la *t*-Student. ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ vs CTL.

1.4. Efecto del compuesto VCE-003 sobre células endoteliales *in vitro*

Como se ha comentado anteriormente, la entrada de células inmunes al parénquima nervioso en situaciones de neuroinflamación está facilitada por un aumento de los niveles de moléculas de adhesión y factores quimiotácticos. Con el fin de conocer si el compuesto VCE-003 podría afectar a los niveles de moléculas de adhesión, se utilizó como aproximación cultivos de células endoteliales de ratón de la línea celular bEnd5, para la valoración de la molécula de adhesión VCAM-1, principalmente implicada en la adhesión a la BHE para la posterior extravasación de linfocitos al parénquima nervioso. En primer lugar, se realizaron las inmunocitoquímicas de dichos cultivos con dos marcajes, la proteína de uniones estrechas *zonula occludens 1* (ZO-1) y VCAM-1, para investigar si ante un estímulo inflamatorio se alteraban los niveles a las 24 horas. Se observó un aumento en el marcaje de VCAM-1 de las células endoteliales cerebrales estimuladas con IL-1 β (10 ng/ml) y TNF α (10 ng/ml), que se redujo al pretratar las células durante 15 minutos con VCE-003 (10 μ M) (Figura 21A).

A continuación, se procedió a realizar una curva dosis-respuesta del compuesto VCE-003 para determinar los niveles de la porción soluble de VCAM-1 (sVCAM-1) liberada al sobrenadante a las 24 horas, mediante ELISA. Como se observa en la Figura 21B, el tratamiento con VCE-003 (0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M) no indujo *per se* liberación de sVCAM-1. Tras la estimulación con IL-1 β (10 ng/ml) y TNF α (10 ng/ml), se observó un aumento significativo en los niveles de sVCAM-1 en los sobrenadantes ($p < 0,001$), y el pretratamiento con VCE-003 redujo de manera dosis-dependiente la liberación de sVCAM-1 (10 μ M: $p < 0,001$) (Figura 21B). Dadas las características de VCE-003 como agonista de los receptores CB2 y PPAR γ , se investigó si la reducción de los niveles de VCAM-1 era mediado por dichos receptores. Para ello, se utilizaron los antagonistas AM630 (1 μ M, para el receptor CB2) y GW9662 (0,1 μ M, para el receptor PPAR γ). Los resultados mostraron un bloqueo significativo del efecto de VCE-003 sobre la liberación de VCAM-1 en los sobrenadantes, tanto con los antagonistas por separado (AM630: $p < 0,001$; GW9662: $p < 0,01$) como en conjunto ($p < 0,01$; Figura 21C).

La activación de NF κ B juega un papel importante en la regulación de la inflamación en diferentes enfermedades humanas y modelos animales. Concretamente, la activación de NF κ B en células endoteliales induce la sobreexpresión de moléculas de adhesión y citoquinas, lo que lleva a un mayor reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos a los ambientes inflamatorios (Ghosh y Hayden, 2008). Debido a que NF κ B posee un sitio de unión en el promotor del gen *VCAM-1* (Lim y cols., 2012), se decidió analizar el nivel de fosforilación del inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B α (I κ B α , del inglés *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-alpha*), una kinasa cuya fosforilación está implicada en la

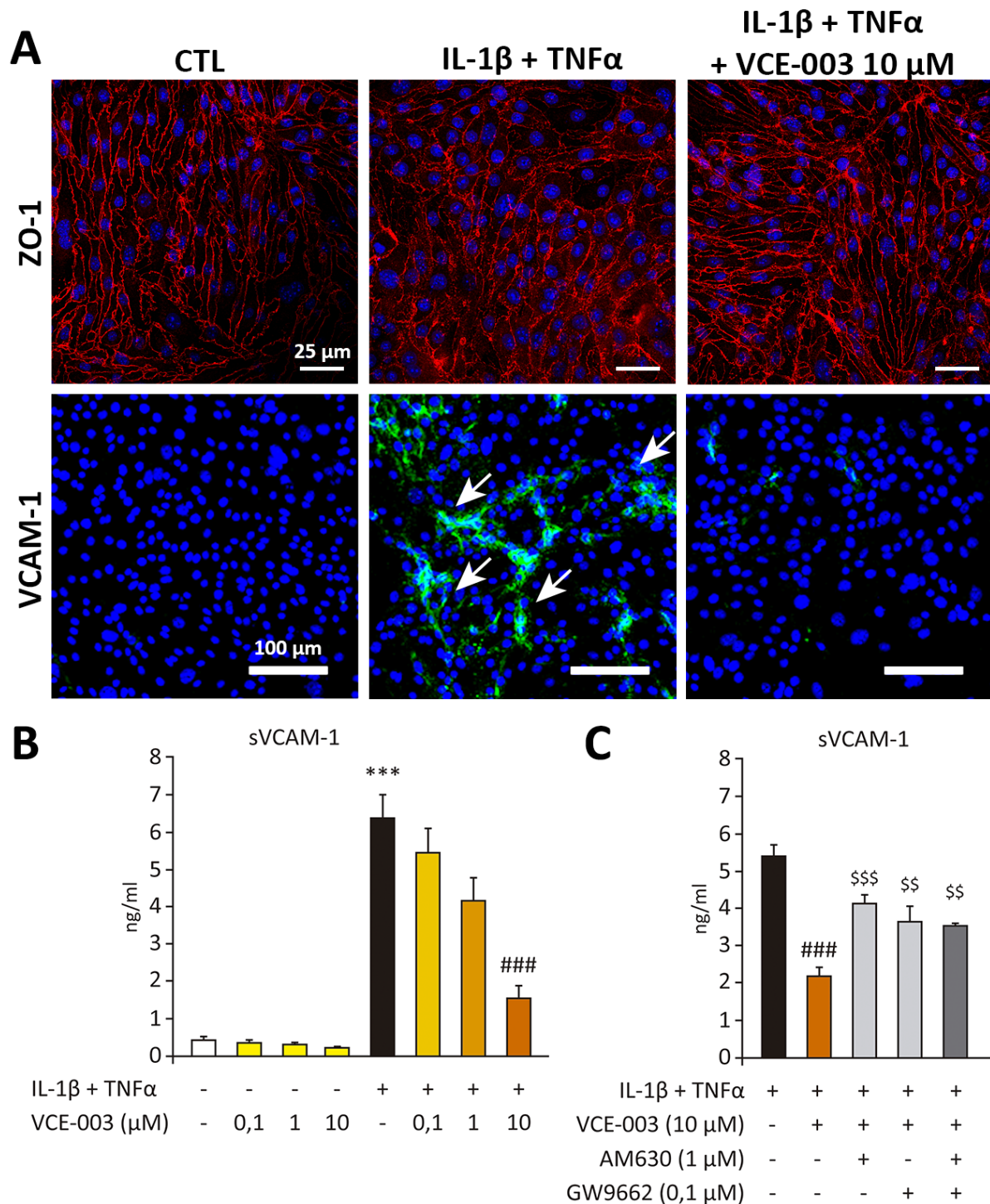


Figura 21. VCE-003 disminuye de manera dosis-dependiente la expresión de VCAM-1 inducida por un estímulo inflamatorio, y su efecto está mediado por los receptores CB2 y PPAR γ . (A) El marcaje de VCAM-1 aumentó tras la estimulación con IL-1 β (10 ng/ml) + TNF α (10 ng/ml), y el pretratamiento con VCE-003 (10 μ M) redujo a niveles basales a las 24 horas. Barra de escala: ZO-1, 25 μ m; VCAM-1, 100 μ m. (B, C) Determinación por la técnica de ELISA de la concentración de sVCAM1 en sobrenadante de cultivos de células endoteliales cerebrales bEnd5 a las 24 horas. La concentración de sVCAM-1 en los sobrenadantes se redujo de manera dosis-dependiente con el pretratamiento con VCE-003 (B). El bloqueo con antagonistas de los receptores CB2 (AM630, 1 μ M) y PPAR γ (GW9662, 0,1 μ M) revirtió los efectos del compuesto VCE-003, incrementando la concentración de sVCAM-1 en los sobrenadantes. Los datos se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. Para el análisis estadístico se usó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. *** p <0,001 vs CTL; ### p <0,001 vs IL-1 β + TNF α ; \$\$ p <0,01 \$\$\$ p <0,001 vs IL-1 β + TNF α + VCE-003.

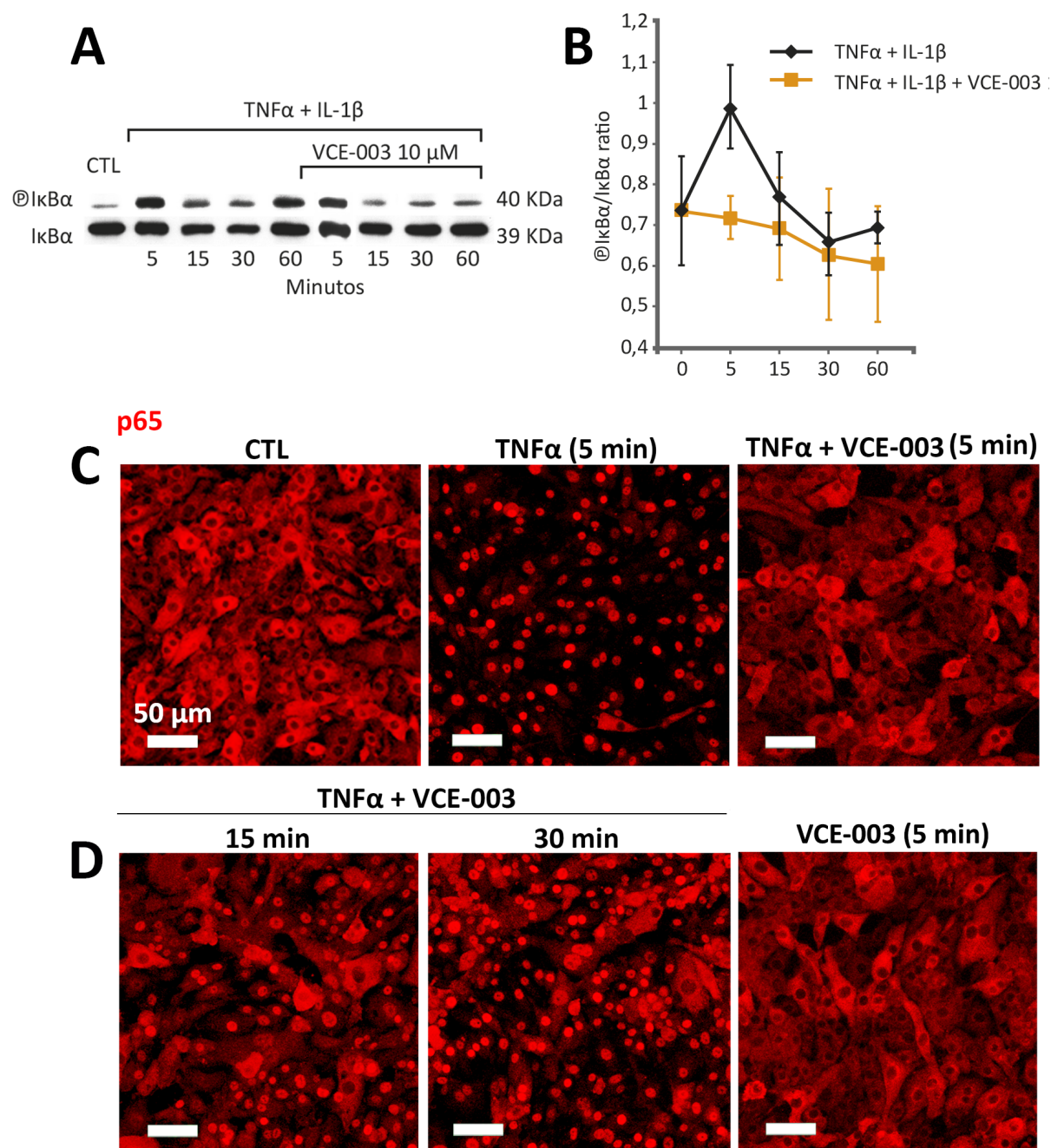


Figura 22. Curso temporal de la fosforilación de IκBα después de un estímulo inflamatorio y con el tratamiento con VCE-003. Células endoteliales bEnd5 fueron estimuladas con TNFα (10 ng/ml) e IL-1β (10 ng/ml), o bien tratadas con VCE-003 (10 μM). Se realizaron lisados celulares a diferentes tiempos: 5, 15, 30 y 60 minutos. La señal de ①IκBα obtenida mediante Western blot (A) y analizada por densitometría (B) se relativizó a la señal de IκBα total. Cinco minutos después de estimular a las células con TNFα + IL-1β se apreció una tendencia en la fosforilación de IκBα, que fue reducido por el tratamiento con VCE-003 ($p=0,07$). Los datos se muestran como la media \pm SEM, de tres experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia estadística se obtuvo con el test paramétrico *t*-Student. (C) Imágenes de la inmunocitoquímica para p65, de un cultivo de células bEnd5 estimuladas con TNFα (10 ng/ml) y tratadas con VCE-003 (10 μM). En ellas apreciamos que VCE-003 evita la translocación al núcleo de p65 a los 5 minutos, y que dicha translocación va teniendo lugar progresivamente a tiempos posteriores (D). El compuesto VCE-003 no influyó en la translocación de p65 al núcleo en células sin estimular (D).

cascada de señalización que finaliza con la translocación de la subunidad p65 al núcleo y la activación de NF κ B. Para ello, se realizaron cultivos con la línea celular bEnd5, que fueron estimulados con IL-1 β (10 ng/ml) y TNF α (10 ng/ml) para inducir la producción de VCAM-1, en ausencia de VCE-003 y tratando las células con VCE-003 (10 μ M). Los niveles de proteínas de lisados celulares se analizaron por Western blot. El nivel de fosforilación se estudió a diferentes tiempos: 5, 15, 30 y 60 minutos, y la señal de pI κ B α se normalizó con la señal de I κ B α . Como se muestra en la Figura 22A y 22B, el estímulo con IL-1 β y TNF α produjo un pico de fosforilación de I κ B α a los 5 minutos, y el tratamiento con VCE-003 indujo una tendencia a reducir esta fosforilación ($p=0,07$).

En esta línea, se observó mediante inmunocitoquímica que el estímulo inflamatorio inducido por TNF α producía a los 5 minutos una translocación total de p65 al núcleo celular, y que el tratamiento con VCE-003 retrasaba dicha translocación (Figura 22C y D).

1.5. Efecto del CBG y VCE-003 sobre la maduración de oligodendrocitos *in vitro*

En patologías como la EM, se ha descrito un proceso de remielinización espontáneo llevado a cabo por los OPCs, y por tanto la diferenciación de éstos hacia oligodendrocitos maduros puede contribuir a promover una remielinización funcional y la recuperación de las deficiencias neurológicas (Franklin y Ffrench-Constant, 2008). Trabajos previos han demostrado que agonistas de receptores cannabinoides, como el endocannabinoide 2-AG, inducían la diferenciación de OPCs *in vitro* a oligodendrocitos maduros (Gómez y cols., 2010; 2011).

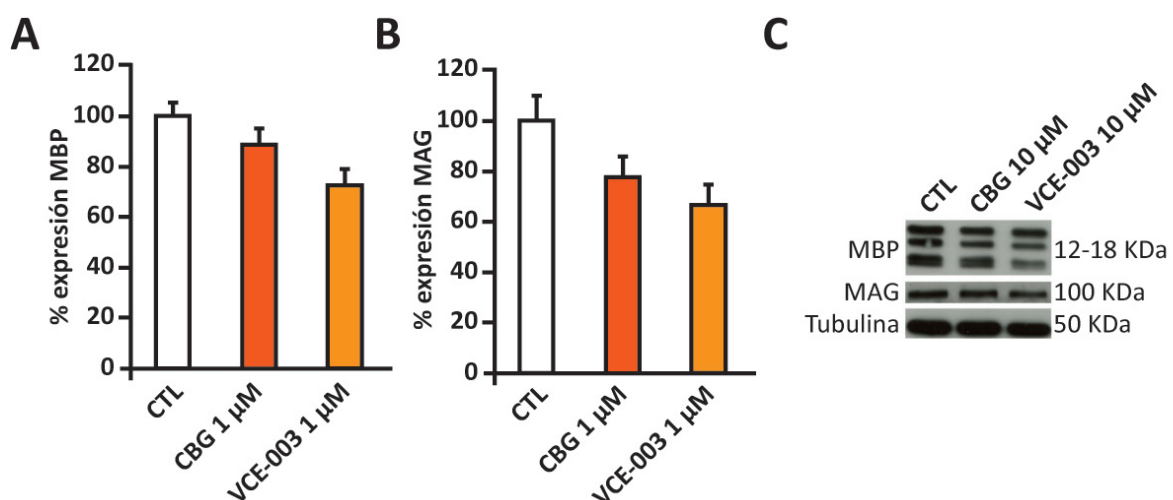


Figura 23. El tratamiento con CBG o VCE-003 no induce un proceso de diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros. Cultivos de OPCs de rata fueron tratados con CBG (1 μ M) o VCE-003 (1 μ M) durante 5 días, y se analizaron dos marcadores de oligodendrocitos maduros, MBP y MAG, por Western blot. Los datos se relativizaron a la señal de tubulina, y se muestran como la media \pm DEM. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadruplicado.

Así, valoramos si el CBG y su derivado quinona, VCE-003, eran capaces de favorecer dicha diferenciación. Para ello, se realizaron cultivos primarios de OPCs de rata, en presencia de CBG (1 μ M) o de VCE-003 (1 μ M) durante 5 días, y se observó si los tratamientos modificaban los niveles de dos marcadores de oligodendrocitos maduros, la proteína básica de mielina (MBP), y de la glicoproteína asociada a mielina (MAG), mediante la técnica de Western blot. Ninguno de los dos compuestos a la dosis utilizada indujo cambios significativos de dichos marcadores respecto al control, por lo que se consideró que no influían en la maduración de los OPCs (Figura 23).

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos *in vitro* sugieren que el compuesto derivado de CBG, VCE-003, ejerce un efecto neuroprotector y antioxidante, reduciendo la muerte neuronal e induciendo la expresión de la vía Nrf2. Asimismo, VCE-003 induce un efecto antiinflamatorio, reduciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y la expresión de iNOS, y es capaz de disminuir los niveles de la molécula de adhesión VCAM-1 en un ambiente inflamatorio.

1.6. Papel antiinflamatorio y neuroprotector del compuesto VCE-003 en el modelo de EM de etiología viral, TMEV-IDD

Tras la valoración del efecto antiinflamatorio, neuroprotector y antioxidante del compuesto VCE-003 en cultivos celulares *in vitro*, el siguiente objetivo de este estudio consistió en la valoración del efecto antiinflamatorio y neuroprotector de VCE-003 *in vivo*, en la fase crónica de los modelos de EM de uso más extendido, el modelo de etiología viral, TMEV-IDD; y el modelo de etiología autoinmune, EAE.

En primer lugar, se utilizó el modelo TMEV-IDD como modelo de EM-PP, mediante la inoculación intracerebral del virus de Theiler en ratones hembra de la cepa susceptible SJL/J, para estudiar la dosis más efectiva de compuesto VCE-003. A los 79 dpi fueron evidentes las deficiencias motoras de los ratones, momento en el que se comenzó el tratamiento con el compuesto VCE-003, que fue administrado diariamente por vía intraperitoneal durante 14 días, hasta la finalización del experimento (93 dpi). Antes del sacrificio de los animales, se procedió a realizar la prueba de movilidad en el actímetro.

Se inyectó vehículo a los animales infectados del grupo TMEV+VEH, y a los demás animales las dosis de 1 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg de VCE-003, dependiendo del grupo de tratamiento. Como se observa en la Figura 24, respecto a la actividad horizontal medida en el actímetro, que refleja la actividad espontánea de los animales, los animales infectados tratados con vehículo mostraron una reducción significativa en el movimiento horizontal ($p<0,01$) respecto al grupo Sham. La dosis de VCE-003 de 1 mg/kg no resultó efectiva y no modificó las alteraciones motoras mostradas en animales infectados. La dosis de 5 mg/kg mostró mejoras no significativas, y los

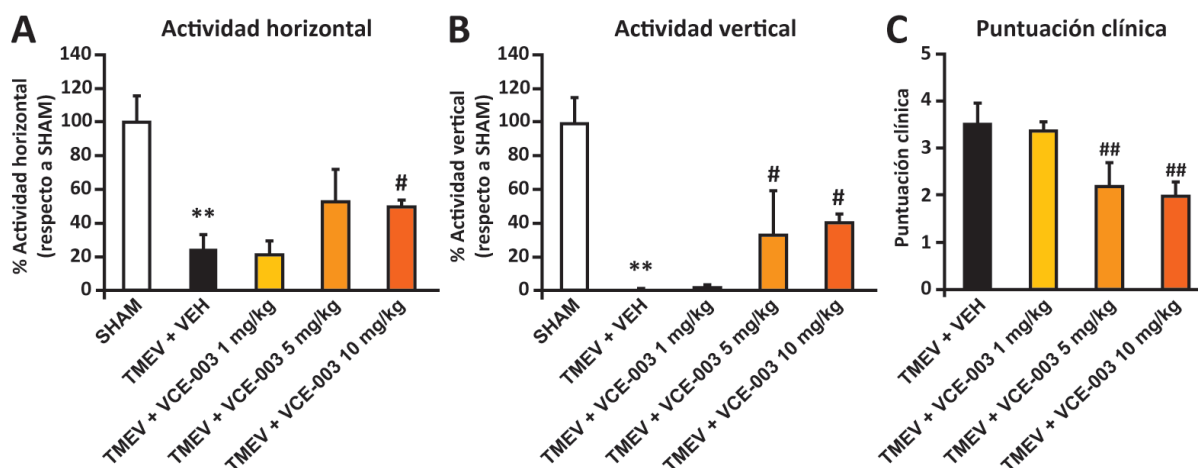


Figura 24. VCE-003 revierte parcialmente las alteraciones en la función motora de los ratones TMEV-IDD a diferentes dosis, tratados en fase terapéutica. Actividad horizontal (A) y vertical (B) de los animales medida con la prueba del actímetro. Como se puede observar, la dosis más efectiva con significancia estadística de VCE-003 fue la de 10 mg/kg, aunque la dosis de 5 mg/kg mejoró de manera parcial pero significativa los síntomas motores asociados al movimiento vertical de los ratones. (C) Valoración neuropatológica de los animales, otorgándoles una puntuación clínica según su sintomatología. Mediante la evaluación de este parámetro, se observó que tanto la dosis de 5 como la de 10 mg/kg fueron efectivas en la reducción de los síntomas motores que presentaron los animales tratados con vehículo. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. El tamaño muestral fue el siguiente: SHAM, $n=6$; TMEV+VEH, $n=4$; TMEV+VCE-003 1 mg/kg y 10 mg/kg, $n=5$; TMEV+VCE-003 5 mg/kg, $n=4$. La significancia estadística se determinó con el test no paramétrico de la U-Mann Whitney. * $p<0,05$ ** $p<0,01$ vs SHAM; # $p<0,05$ vs

ratones que recibieron la dosis de 10 mg/kg manifestaron una mejoría significativa en su actividad horizontal ($p<0,05$), respecto a los animales tratados con vehículo (Figura 24A).

En relación a la actividad vertical, la más afectada en el modelo TMEV-IDD, ya que implica a las patas posteriores, los animales infectados que recibieron vehículo revelaron una bajada muy significativa en el movimiento vertical ($p<0,01$), prácticamente ausente, respecto al grupo Sham. La dosis de VCE-003 de 1 mg/kg resultó inefectiva en la actividad vertical, mientras que las dosis de 5 y 10 mg/kg mejoraron significativamente dicha respuesta ($p<0,05$; Figura 24B).

También se determinó el estado neurológico de los ratones al final del experimento, otorgándoles una puntuación clínica que se detalla en el apartado 1.1.2.2 de Métodos experimentales y material (Figura 24C). Los animales Sham (inoculados intracerebralmente con vehículo) no mostraron sintomatología alguna. Los animales infectados con el virus de Theiler y tratados con vehículo obtuvieron una puntuación clínica elevada (3,5 de media), lo que significa que todos los animales mostraron parálisis parcial o total en las extremidades posteriores al finalizar el experimento (día 93 pi). Los animales del grupo TMEV tratados con la dosis de 1 mg/kg de VCE-003 no tuvieron mejora en su sintomatología, con una puntuación similar a los animales TMEV tratados con vehículo. Las dosis de 5 mg/kg y 10 mg/kg mostraron una puntuación clínica media más baja (próxima a 2; $p<0,01$), lo que indica que la mayoría de los animales presentaron una ligera dificultad en los movimientos de las extremidades posteriores, pero no mostraron signos de parálisis de las extremidades traseras.

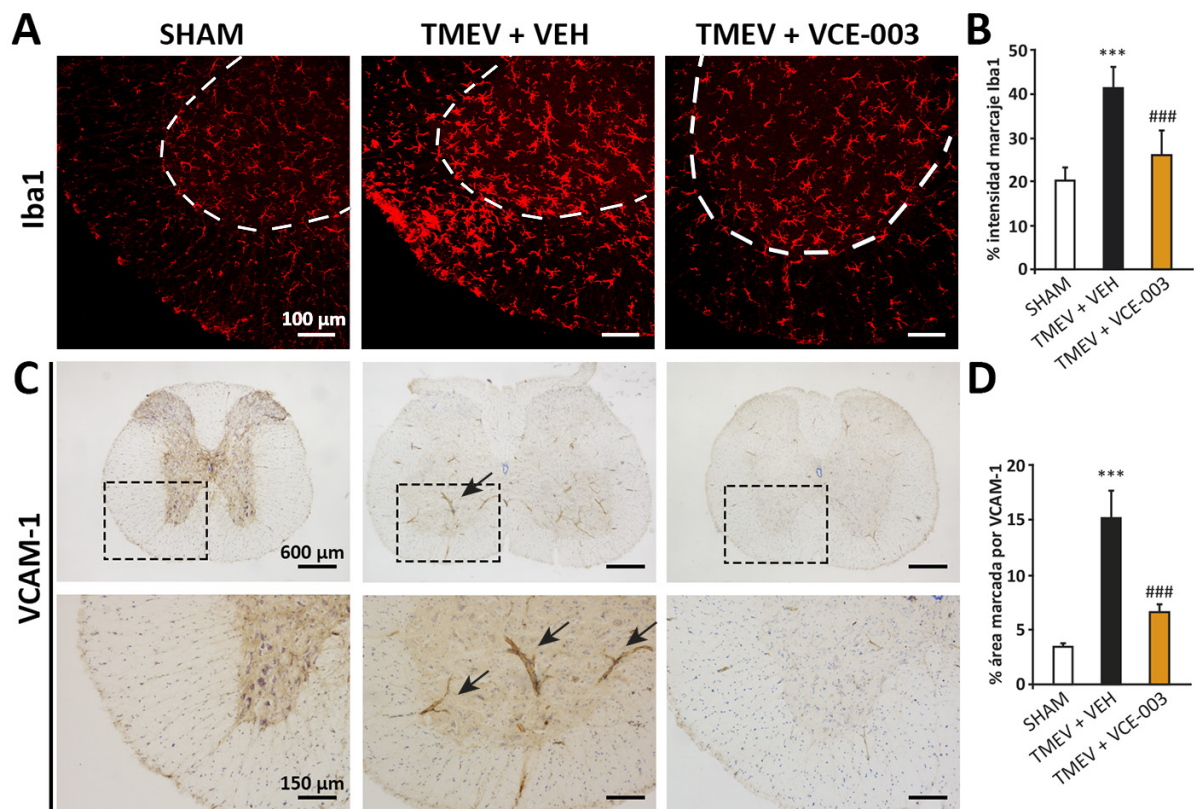


Figura 25. El tratamiento con VCE-003 reduce significativamente la reactividad microglial y la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en animales TMEV-IDD. Imágenes representativas de secciones transversales de médula espinal en las que se han realizado la tinción de inmunofluorescencia con anti-Iba1 (A), y la inmunohistoquímica con anti-VCAM-1 (C). Las cuantificaciones (B, D) se muestran como la media \pm SEM, y se determinó la significancia mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. *** $p < 0,001$ vs SHAM; ### $p < 0,001$ vs TMEV+VEH. Barra de escala: 100 μ m (A), 600 μ m y 150 μ m (C).

1.7. VCE-003 reduce la actividad microglial y la expresión de moléculas de adhesión en el modelo de TMEV-IDD

El análisis histopatológico se realizó con el tejido de animales que recibieron la dosis de 5 mg/kg de VCE-003, por ser la menor dosis que resultó efectiva (Figura 24C).

Las células microgliales juegan un papel importante en TMEV-IDD, siendo productoras de quimioquinas, citoquinas proinflamatorias, ROS y especies reactivas de nitrógeno (Kim y cols., 2005). Por ello, se investigó el efecto del compuesto VCE-003 en la actividad microglial en la médula espinal de animales infectados con TMEV mediante la expresión del marcador de microglía Iba1. El análisis inmunohistoquímico mostró que la infección con el virus de Theiler conlleva un aumento en la intensidad de fluorescencia de las células Iba1⁺ en la médula espinal a nivel torácico-lumbar, sugiriendo un estado de activación en dichas células ($p < 0,001$; Figura 25B). Dicha reactividad microglial se redujo significativamente con el tratamiento con VCE-003 ($p < 0,001$), a niveles próximos a los cuantificados en el grupo Sham.

Además, en el modelo de TMEV-IDD se ha descrito que las moléculas de adhesión, y en concreto VCAM-1, están inducidas en el modelo favoreciendo la activación y reclutamiento de

los linfocitos (Mestre y cols., 2009). Precisamente, el bloqueo mediante anticuerpos monoclonales de moléculas de adhesión está relacionado con una mejora de los síntomas en este modelo de EM (Inoue y cols., 1997). Por ello, se analizó si el tratamiento con VCE-003 podría afectar a la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en médula espinal. Como se observa en la Figura 25C, la infección con el virus de Theiler indujo significativamente la expresión de VCAM-1 ($p < 0,001$), y esta expresión se inhibió de manera significativa en los animales infectados tratados con VCE-003 ($p < 0,001$; Figura 25C).

Conjuntamente, estos resultados indican que el tratamiento con VCE-003 induce una reducción en la reactividad microglial en la médula espinal de ratones infectados con el virus de Theiler, así como una disminución en la expresión de VCAM-1 (corroborando lo observado en los experimentos *in vitro*).

1.8. VCE-003 atenúa la severidad clínica del modelo de etiología autoinmune de EM, EAE

Una vez observado el efecto antiinflamatorio del tratamiento con VCE-003 en el modelo TMEV-IDD, se realizaron experimentos para ver si se replicaba el potencial terapéutico en el modelo de autoinmunidad de EM, EAE, iniciando el tratamiento cuando comenzaron los primeros síntomas clínicos (7 dpI). La inmunización subcutánea con MOG₃₅₋₅₅ indujo la sintomatología clásica asociada a la EAE en todos los animales que recibieron el vehículo, con una evolución de la enfermedad ya descrita en estudios anteriores (Gómez-Nicola y cols., 2010). Todos los ratones tratados con vehículo desarrollaron unos síntomas severos que alcanzaron su máximo nivel a 17 dpI (cuatro animales alcanzaron una puntuación clínica de 5, por lo que fueron sacrificados a 18 dpI). Por el contrario, se atenuó la manifestación clínica de los animales que recibieron diariamente inyecciones intraperitoneales de VCE-003 (5 mg/kg) desde el día 7 (Figura 26A). En estos animales tratados con VCE-003, la media del inicio de los síntomas se retrasó al día 15 pI ($p < 0,001$ respecto al grupo EAE+VEH) y el pico de los síntomas de la enfermedad se dio a los 23 dpI, sin llegar a alcanzar una puntuación clínica de 1, y sin mostrar signos de paraparesia o tetraparesia durante el curso del experimento (día 7 a día 28).

Además, los animales tratados con VCE-003 no exhibieron la reducción de peso observada en los animales tratados con vehículo a partir del día 12 pI (Figura 26B), siendo significativa esta variación de peso desde el día 18 pI ($p < 0,001$) hasta el final del experimento (28 dpI; $p < 0,05$).

Dado que el compuesto VCE-003 actúa como agonista del receptor de PPAR γ y del receptor CB2 (Granja y cols., 2012), se determinó el tipo de receptor involucrado en los efectos beneficiosos observados con el tratamiento con VCE-003 en el modelo de EAE. Para ello, se administró intraperitonealmente el antagonista selectivo del receptor CB2 AM630 (2 mg/kg), o del receptor

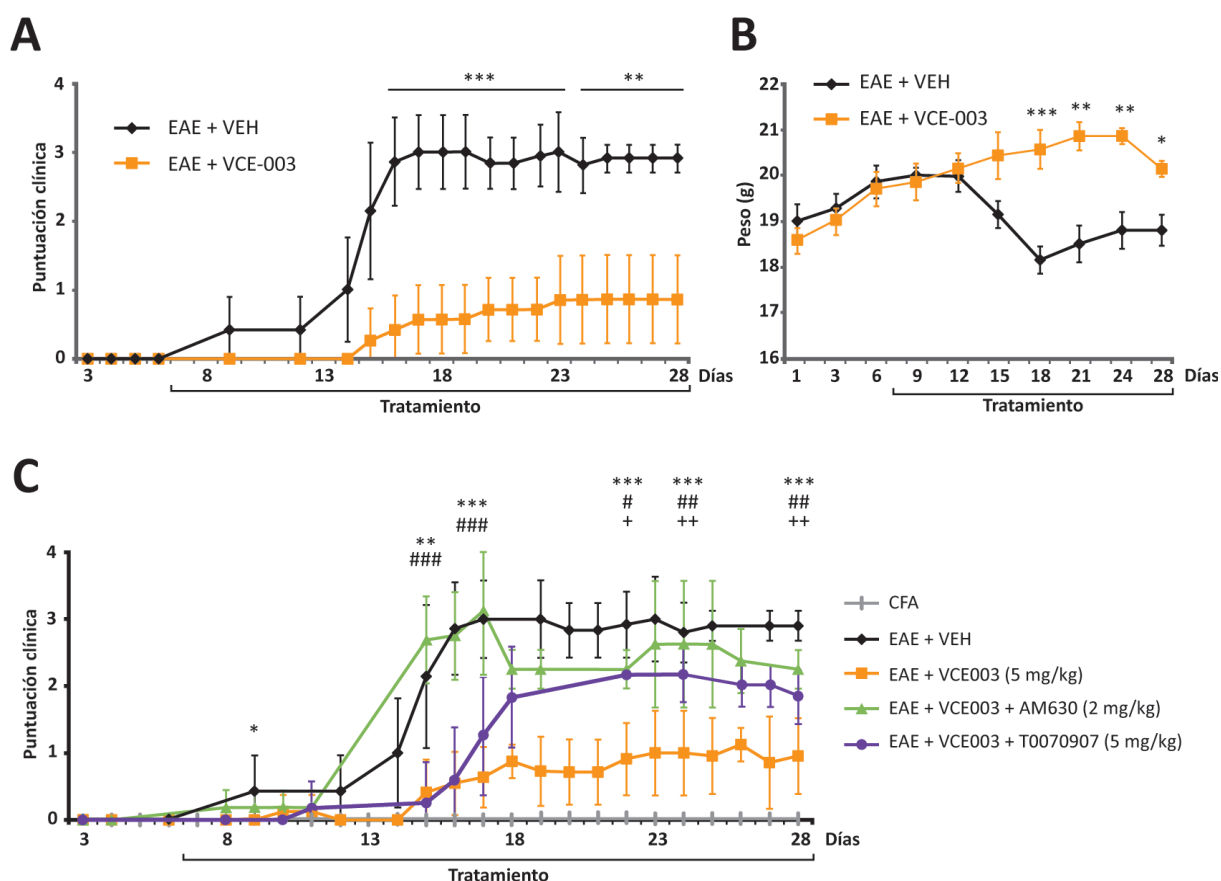


Figura 26. El tratamiento con VCE-003 mejora significativamente los síntomas neuropatológicos asociados a la EAE, a través de la activación de los receptores CB2 y PPAR γ . (A) VCE-003 condujo a una reducción sustancial en la sintomatología inducida por el modelo durante todo el experimento. La diferencia de peso de los animales fue significativa entre el grupo tratado con vehículo y el tratado con VCE-003, ya que el que recibió el compuesto mantuvo constante la ganancia de peso, mientras que los animales del grupo tratado con vehículo perdieron peso cuando los síntomas motores fueron severos a partir de los 15 dpi (B). La administración de los antagonistas del receptor CB2 (AM630) y del receptor PPAR γ (T0070907) revirtió parcialmente el efecto terapéutico ejercido por el compuesto VCE-003 en el modelo de EAE (C). El tamaño muestral fue el siguiente: para los grupos CFA, EAE+VEH, EAE+VCE-003 y EAE+VCE-003+AM630, n=4; para el grupo EAE+VCE-003+T0070907, n=6. Los datos se muestran como la media \pm DEM, y para determinar la significancia estadística se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ EAE+VCE-003 vs EAE+VEH; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ EAE+VCE-

PPAR γ T0070907 (5 mg/kg), 15 minutos antes de inyectar VCE-003 (5 mg/kg). Los resultados de la Figura 26C muestran que el efecto beneficioso del compuesto era bloqueado significativamente con el uso del antagonista de CB2 ($p < 0,01$). De hecho, tanto el grupo de animales tratados con vehículo como el grupo tratado con VCE-003 y antagonista AM630 alcanzaron el pico máximo de la enfermedad a día 17 pI ($p < 0,001$).

Por otro lado, los animales tratados con VCE-003 y antagonista de PPAR γ mostraron una atenuación del efecto de VCE-003 ($p < 0,01$), pero no tan notable como con el uso del antagonista de CB2, alcanzando el pico máximo de la enfermedad a los 22 dpI. Estos resultados sugieren que están involucrados ambos receptores en la capacidad de mejora de los síntomas tras el uso de VCE-003.

1.9. El tratamiento con VCE-003 disminuye los infiltrados celulares, la reactividad microglial y la expresión de marcadores inflamatorios en médula espinal, en el modelo de EAE

A continuación se realizaron análisis histopatológicos en médula espinal de los ratones EAE. Primero, se estableció una graduación de infiltración celular, detallada en el apartado 1.9.3 de Métodos experimentales y material, que fue evaluada en secciones de médula espinal sometidas a la tinción de Nissl. Como se observa en la Figura 27A y B, los animales inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ tratados con VCE-003 mostraron unos niveles menores de infiltrados celulares en comparación con los animales inmunizados y tratados con vehículo únicamente. En esta línea, se determinó el número de linfocitos T CD4⁺ en secciones torácico-lumbares de médula espinal mediante inmunohistoquímica. El número de linfocitos T CD4⁺ de los animales inmunizados tratados con vehículo ($p < 0,01$ respecto al grupo CFA) se vio reducido significativamente con el tratamiento con VCE-003 ($p < 0,05$) (Figura 27C y D).

Los análisis histopatológicos de la médula espinal mostraron que el aumento de la actividad microglial observado en los animales tratados con vehículo se reflejaba en una mayor intensidad tras la tinción con el marcador de microglía Iba1 ($p < 0,001$), y que estos valores se reducían significativamente tras el tratamiento con VCE-003 ($p < 0,05$) (Figura 27E y F). Cabe destacar la morfología activada de las células microgliales en el tejido de los animales TMEV+VEH, con somas engrosados y un menor número de ramificaciones que las observadas en los animales Sham.

Para estudiar la expresión de ARNm de diferentes citoquinas y marcadores proinflamatorios en tejido, se analizó la porción cervical de la médula espinal mediante RT-PCR. Este estudio colaborativo se llevó a cabo en la Universidad de Córdoba, y fue realizado por el grupo de Inmunología del Prof. Eduardo Muñoz. En los animales inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y tratados con vehículo, se apreció un aumento significativo en la expresión de ARNm de las citoquinas proinflamatorias TNF α ($p < 0,05$), IFN γ ($p < 0,001$) e IL-17 ($p < 0,01$; Figura 28A). Los niveles de ARNm de IL-1 β mostraron una tendencia al alza, sin llegar a ser significativos. Esta regulación a la alta del ARNm disminuyó significativamente con el tratamiento con VCE-003, en el caso de las citoquinas TNF α ($p < 0,05$), IFN γ ($p < 0,001$) e IL-17 ($p < 0,01$) (Figura 28A).

También se observó un aumento significativo en la expresión de ARNm de los marcadores proinflamatorios iNOS ($p < 0,01$ respecto al grupo CFA) y de la molécula ICAM-1 en los ratones tratados con vehículo, que era revertido significativamente a niveles control en ambos casos con el tratamiento con VCE-003: iNOS ($p < 0,05$) e ICAM-1 ($p < 0,05$; Figura 28B). Todos estos resultados son indicativos del perfil antiinflamatorio del compuesto VCE-003.

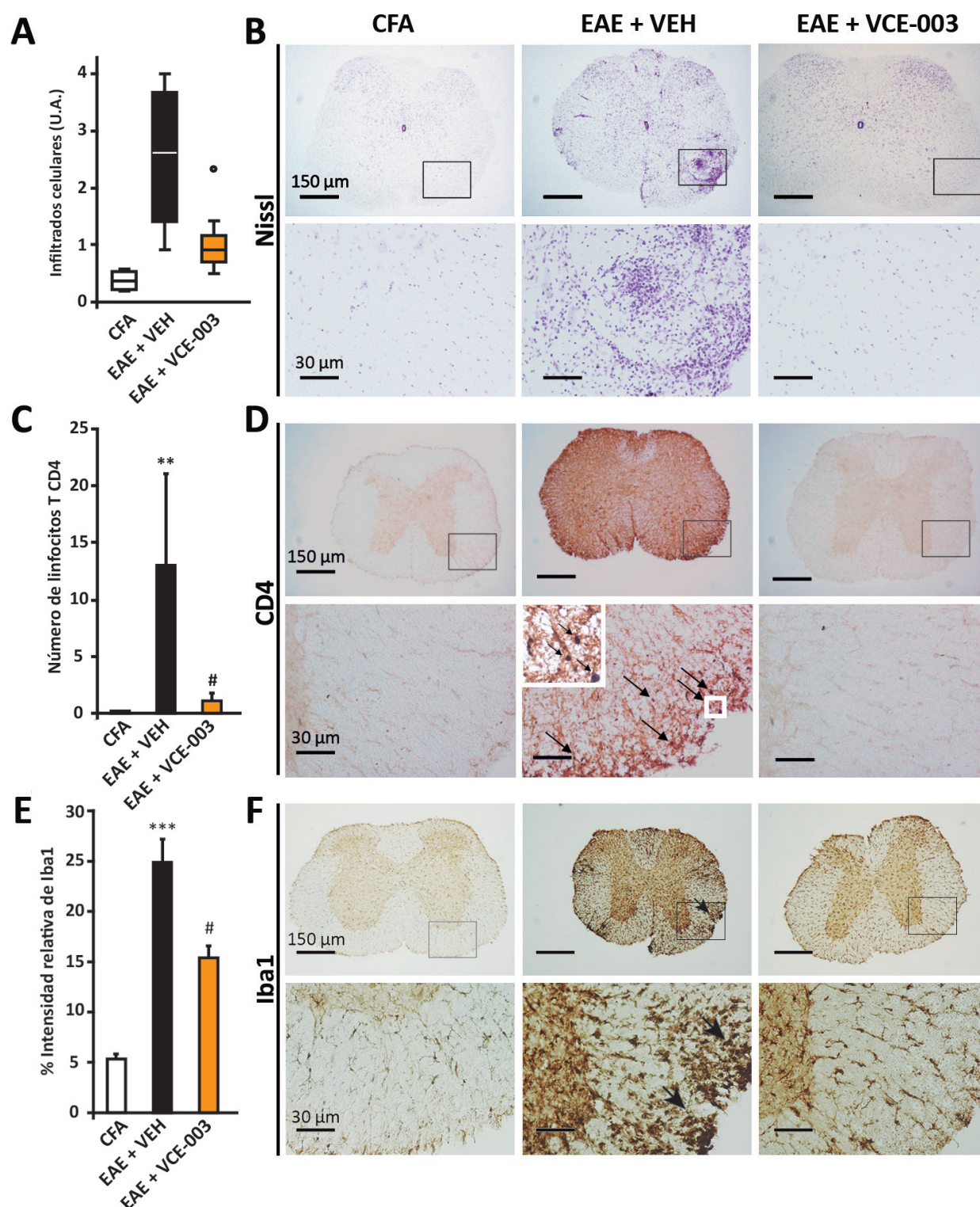


Figura 27. El tratamiento con VCE-003 reduce la cantidad de infiltrados celulares (A), disminuye significativamente el número de linfocitos T CD4 (C) y reduce significativamente la activación microglial (E) en secciones de médula espinal de animales con EAE. Imágenes representativas de secciones de 30 μ m, en las que se han realizado la tinción de Nissl (B), inmunohistoquímica con anti-CD4 (D) e Iba1 (F). El análisis del marcaje de Iba1 se realizó en la sustancia blanca de ambas astas ventrales, de al menos 6 secciones de por animal, y los recuentos de infiltrados celulares y linfocitos T CD4 se realizaron en toda la sección. Las cuantificaciones se muestran como la media \pm SEM. Se determinó la significancia mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. $**p < 0,01$ vs CFA; $\#p < 0,05$ vs TMEV+VEH. Barra de escala: 150 μ m y 30 μ m.

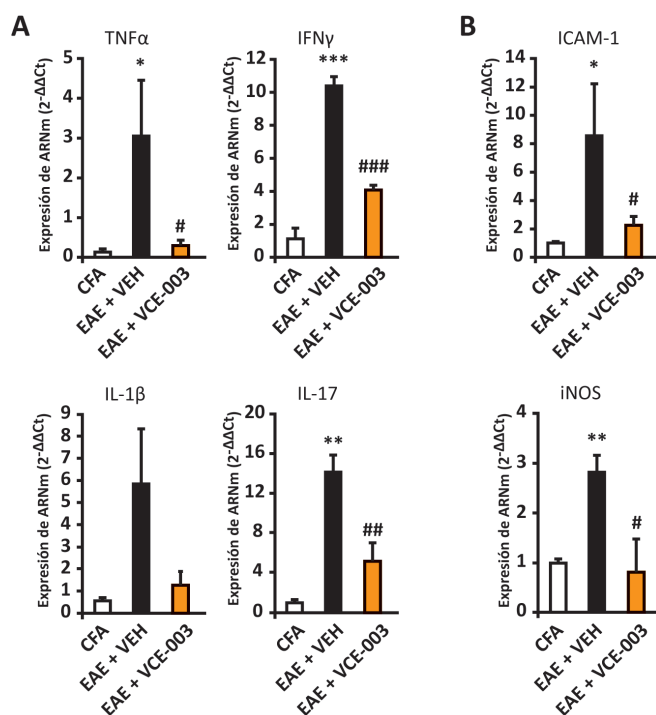


Figura 28. VCE-003 reduce significativamente la expresión de ARNm de los marcadores inflamatorios TNFα, IFNγ e IL-17 (A), y de la molécula de adhesión ICAM-1 e iNOS (B) en la médula espinal de animales con EAE. La muestra fue de n=4 animales por grupo. Los datos se han presentado como la media ± SEM, y para obtener la significancia estadística se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs CFA; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs EAE+VEH.

1.10. VCE-003 reduce el daño axonal en animales inmunizados y preserva la estructura de la mielina en el modelo de EAE

Dado el efecto beneficioso en la sintomatología clínica y en los mediadores inflamatorios, se investigó el posible efecto neuroprotector del compuesto VCE-003, para lo cual se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para neurofilamento (Figura 29A y B), en secciones torácico-lumbares transversales y longitudinales de médula espinal, que mostraron las alteraciones axonales en los animales inmunizados y tratados con vehículo, tales como engrosamientos y estrechamientos en los axones, incluso transecciones axonales, ya descritos en pacientes de EM (Dutta y Trapp, 2011). En los animales tratados con VCE-003, se apreciaron alteraciones menos marcadas que en los ratones que recibieron vehículo. Estos resultados se confirman valorando el daño axonal mediante una tinción inmunohistoquímica contra el neurofilamento H no fosforilado (SMI32; Figura 29C). En las secciones longitudinales torácico-lumbares de médula espinal de animales inmunizados fue evidente la desorganización axonal, con engrosamientos y transecciones, mientras que las secciones de los animales tratados con VCE-003 presentaban un aspecto más parecido al grupo de control (Figura 29B y C).

Con respecto a la integridad de las vainas de mielina, se realizó una tinción de LFB que exhibió áreas de desmielinización en los animales tratados con vehículo, mientras que las secciones de médula espinal de los ratones tratados con VCE-003 presentaban una preservación de la mielina (Figura 30A). Este hecho se observó también con la tinción de inmunofluorescencia del marcador de mielina no compacta RIP, en la que se evidenciaba una desestructuración de la mielina que rodea los axones en animales tratados con vehículo, y una preservación de la mielina en los tratados con VCE-003 (Figura 30B).

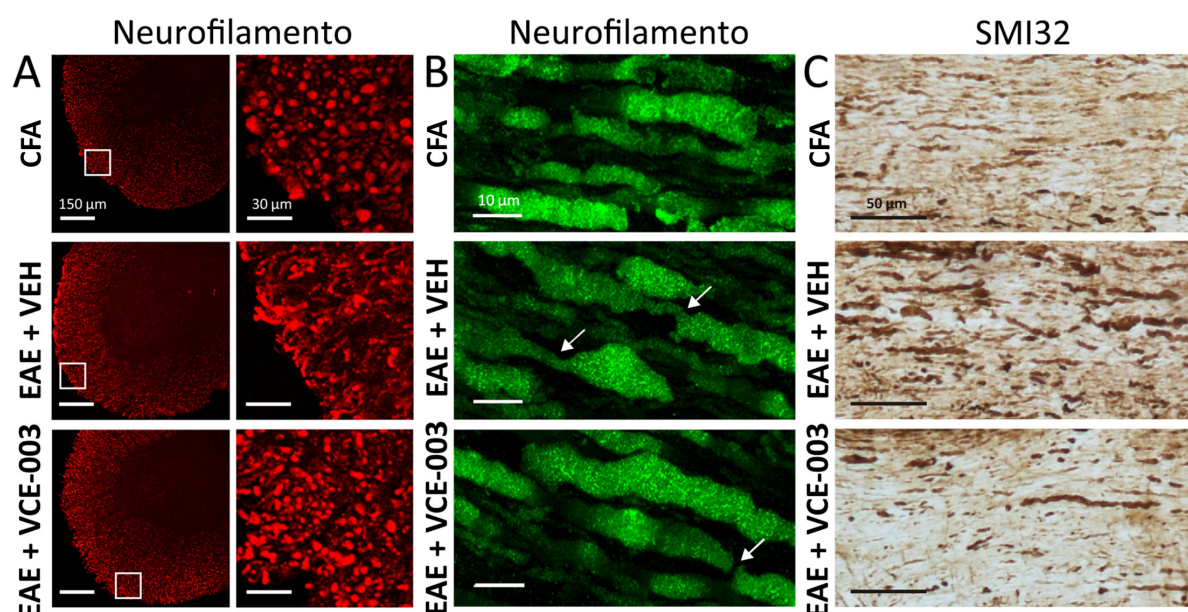


Figura 29. VCE-003 reduce el daño axonal en médula espinal de animales con EAE. Imágenes representativas de los cambios en la morfología axonal en secciones transversales (A) y longitudinales (B y C) torácico-lumbares de médula espinal de 30 μm de grosor, que muestran por inmunofluorescencia Neurofilamento (A y B) y por inmunohistoquímica SMI32 (C). Con el tratamiento con VCE-003 se observó en la médula espinal una menor desestructuración axonal, menor número de engrosamientos y transecciones axonales respecto a los animales tratados con vehículo. Barra de escala: 150 μm y 30 μm (A), 10 μm (B) y

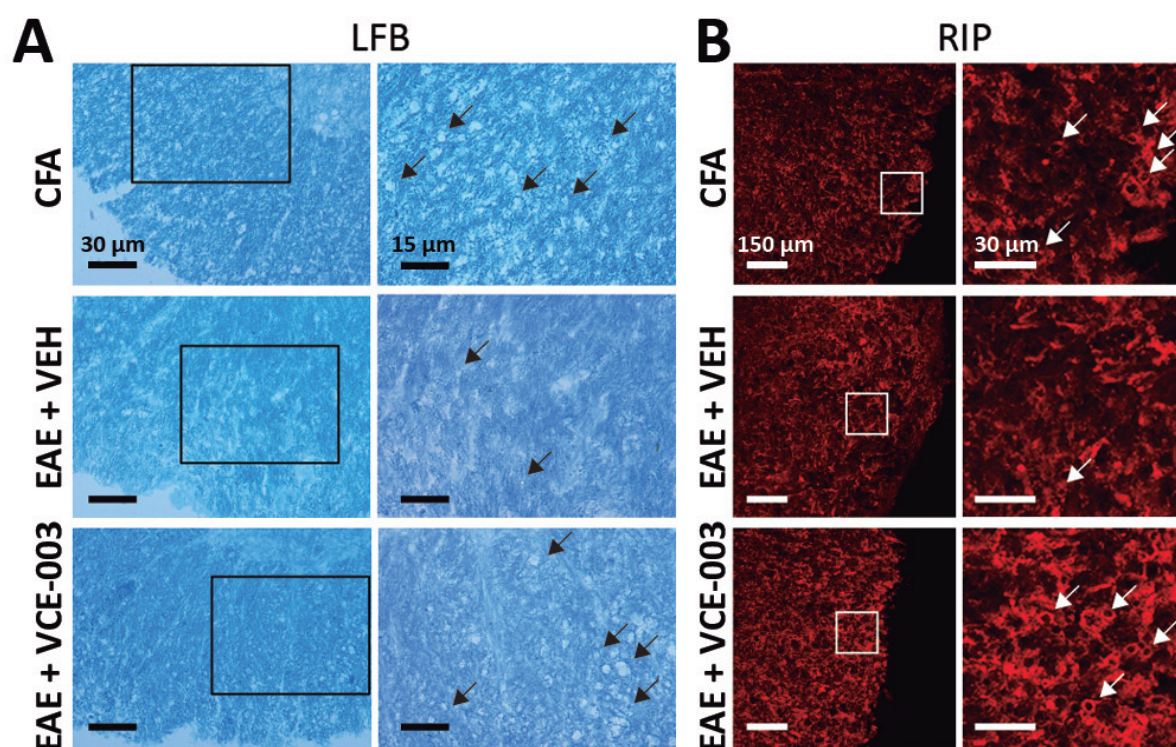


Figura 30. El tratamiento con VCE-003 preserva la estructura de la mielina. Imágenes representativas de secciones transversales torácico-lumbares de médula espinal de animales con EAE tras la tinción de LFB e inmunohistoquímica de RIP, proteína de mielina no compacta (A y B, respectivamente). Las secciones obtenidas del grupo que recibió vehículo muestran desmielinización, y el compuesto VCE-003 contribuye al mantenimiento de la estructura de la mielina. Barra de escala: 30 μm y 15 μm (A); 150 μm y 30 μm (B).

1.11. Activación de la vía antioxidante de Nrf2 tras el tratamiento con el compuesto VCE-003 en el modelo de EAE

Como se ha explicado anteriormente, la transcripción de *Nrf2* es el primer mecanismo de actuación frente al exceso de estrés oxidativo, promoviendo la protección de las estructuras celulares. En la actualidad, cada vez cobra mayor relevancia el estrés oxidativo como mecanismo patogénico en EM. Para investigar la activación *in vivo* de la vía de Nrf2, y comparar el resultado con lo obtenido en los cultivos *in vitro*, se cuantificó la cantidad de ARNm de Nrf2 en tejido de médula espinal cervical de ratones inmunizados del modelo de EAE, mediante RT-PCR. Como observamos en la Figura 31, los animales tratados con vehículo mostraron un aumento en los niveles de ARNm de Nrf2 ($p < 0,05$), seguramente para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por el modelo. Los niveles de ARNm después del tratamiento con VCE-003 fueron similares a los de animales control.

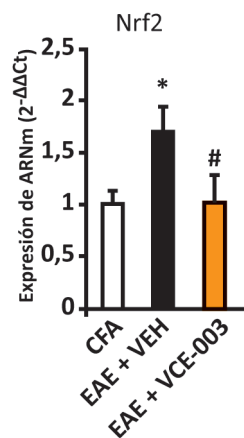


Figura 31. El compuesto VCE-003 no aumenta la expresión de ARNm de Nrf2 en médula espinal de animales con EAE. El tamaño muestral por grupo fue de $n=4$. Los datos se representan como la media \pm SEM, y para determinar la significancia se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$ vs CFA; # $p < 0,05$ vs EAE+VEH.

1.12. El compuesto VCE-003.2 atenúa la severidad clínica característica del modelo de EAE

En comparativa con los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores del compuesto VCE-003, continuamos el estudio investigando el potencial terapéutico de un nuevo derivado de VCE-003 no electrofílico, el compuesto VCE-003.2, en el modelo de EAE. En concreto, este compuesto presenta más afinidad por el receptor PPAR γ que VCE-003 (Díaz-Alonso y cols., en preparación), pero pierde la afinidad que presentaba por el receptor CB2.

Una vez iniciada la sintomatología a 7 dpI, los animales comenzaron a recibir los diferentes tratamientos ese mismo día por vía intraperitoneal: vehículo o VCE-003.2 (10 mg/kg). Los animales inmunizados tratados con vehículo alcanzaron su máximo grado de severidad clínica el día 17 pI ($p<0,001$), mostrando signos de paraparesia trasera moderada. Una vez alcanzado este pico, los síntomas clínicos se mantuvieron constantes hasta el final del experimento ($p<0,001$ respecto a animales control, Figura 32A).

Los animales tratados con VCE-003.2 presentaron durante gran parte del experimento una respuesta intragrupo muy variable, pero al finalizar el experimento también mejoraba significativamente las deficiencias neurológicas presentes en los animales tratados con vehículo ($p<0,05$) (Figura 32A). En lo que concierne a la puntuación clínica acumulada, se pudo observar una mejora de la sintomatología con el tratamiento con VCE-003.2, respecto a los animales inmunizados tratados con vehículo (Figura 32B).

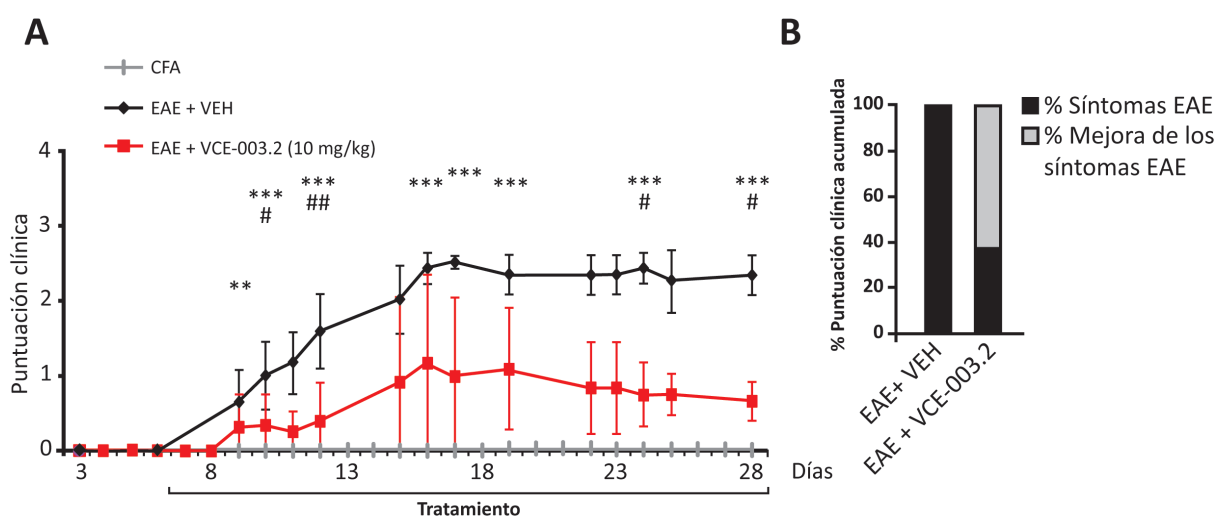


Figura 32. El tratamiento con VCE-003.2 mejora significativamente la severidad neuropatológica de los animales inmunizados en el modelo de EAE (A). La puntuación clínica acumulada (B) se determinó sumando los valores obtenidos por todos los ratones dentro del mismo grupo, y relativizándolos a los obtenidos en el grupo EAE+VEH (100%). El tamaño muestral de los grupos fue el siguiente: CFA, EAE+VEH y EAE+VCE-003.2, n=6. Los datos se muestran como la media \pm DEM, y la significancia estadística se obtuvo aplicando a los datos la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ EAE+VEH vs CFA; # $p<0,05$ ## $p<0,01$ EAE+VCE-003.2 vs EAE+VEH.

1.13. VCE-006 no reduce la severidad clínica del modelo de EAE

A continuación, se investigó la eficacia terapéutica del compuesto VCE-006, un derivado del CBG formado por un dímero de dos moléculas de VCE-003. Para ello se utilizó el modelo de etiología autoinmune, la EAE, comparándolo con el compuesto VCE-003 (Figura 33).

Los animales fueron inmunizados como se ha descrito en el apartado 1.1.2 de Métodos experimentales y material, y éstos comenzaron a mostrar los primeros síntomas de la enfermedad a 7 dpI, tras lo cual se procedió al inicio de los tratamientos, todos por vía intraperitoneal. Un grupo fue tratado con vehículo, otro grupo recibió el tratamiento con VCE-003 (5 mg/kg), y otro grupo recibió VCE-006 (5 mg/kg). Los ratones tratados con vehículo alcanzaron el pico de la enfermedad a los 15 dpI, mientras que los ratones tratados con VCE-003 o VCE-006 retrasaron el inicio de la sintomatología. Los tratamientos mostraron eficacias similares a lo largo del tiempo hasta el día 24 pI. Sin embargo, en los últimos días del experimento el compuesto VCE-006 no consiguió reducir los síntomas motores de la enfermedad, siendo significativos los cambios respecto al VCE-003 al finalizar el experimento ($p<0,01$; día 28 pI).

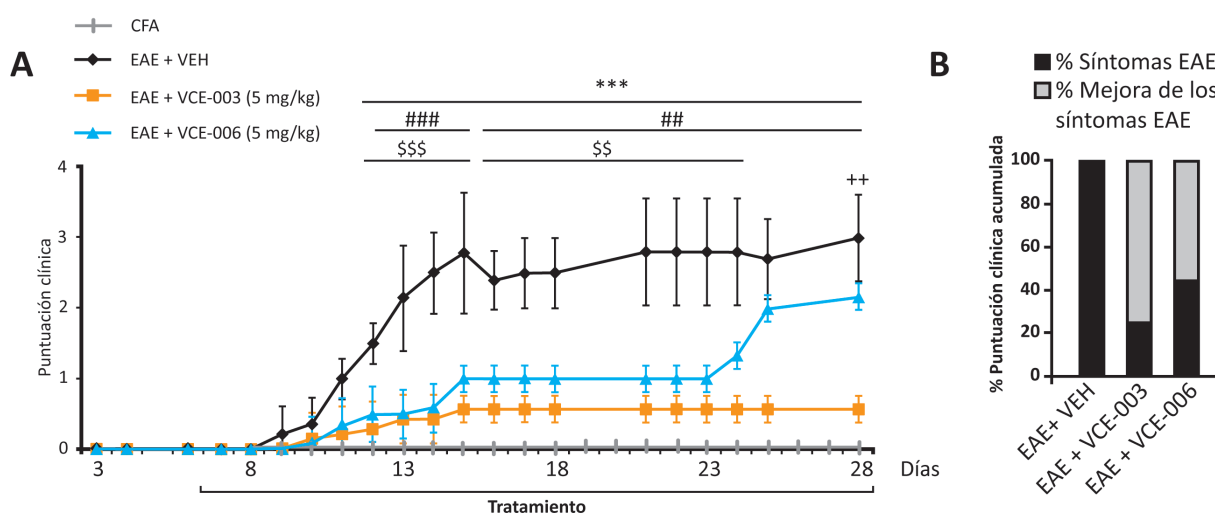


Figura 33. El tratamiento con el compuesto VCE-006 retrasa la progresión de los signos clínicos inducidos por el modelo de EAE. El tamaño muestral fue de $n=6$ animales por grupo. Los datos mostrados corresponden a la media \pm DEM, y para obtener la significancia estadística se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. *** $p<0,001$ EAE+VEH vs CFA; ; ## $p<0,01$ ### $p<0,001$ EAE+VCE-003 vs EAE+VEH; \$\$ $p<0,01$ \$\$\$ $p<0,001$ EAE+VCE-006 vs EAE+VEH; ++ $p<0,01$ EAE+VCE-006 vs EAE+VCE-003.

Después de observar el efecto del tratamiento en el modelo de EAE con los derivados VCE-003.2 y VCE-006, podemos decir que son efectivos en la reducción de la sintomatología asociada al modelo, pero sin alcanzar el efecto ejercido por VCE-003.



2. Estudio del potencial terapéutico de nuevos derivados del cannabidiol: aproximación *in vitro* y con modelos de EM

Por último, se investigó el efecto terapéutico de un derivado del CBD, el compuesto VCE-004.8. Para estudiar su potencial neuroprotector, se utilizaron las líneas celulares de neuronas PC-12 y N2A; y para los experimentos *in vivo* se usaron los dos modelos de EM que se han venido empleando a lo largo de esta tesis doctoral, TMEV-IDD y EAE. Como comparativa, también se utilizó DMF, actualmente comercializado para reducir el número de brotes en pacientes de EM.

2.1. El compuesto VCE-004.8 reduce la muerte neuronal *in vitro* y disminuye la liberación de PGE₂ en cultivos primarios de microglía

Para estudiar si el compuesto VCE-004.8 poseía actividad neuroprotectora, se utilizó una aproximación *in vitro* con la línea PC-12, derivada de feocromocitoma de médula suprarrenal de rata. Tras tratar a las células a diferentes concentraciones del compuesto, 1 μ M y 10 μ M, se observó que a las 24 horas protegía significativamente de la muerte basal de las células en cultivo ($p<0,01$ con ambas concentraciones; Figura 34A). En otro experimento independiente, los cultivos se pre-trataron 15 minutos con las concentraciones de VCE-004.8 anteriormente descritas, añadiéndole como estímulo tóxico glutamato (10 mM). A las 24 horas, la muerte celular inducida por glutamato fue del 60%. El pretratamiento con las diferentes dosis disminuyó de manera significativa hasta en un 80% la muerte celular inducida por glutamato ($p<0,001$). La muerte celular fue cuantificada como la liberación al medio de LDH como medida de muerte celular (Figura 34B), y se relativizó a la muerte inducida por glutamato.

También se utilizó la línea de neuroblastoma de ratón N2A para corroborar este efecto, con las mismas dosis y protocolo de tratamiento. El estímulo de glutamato (10 mM) indujo un 40% de muerte celular, que era disminuida con el pretratamiento con VCE-004.8 (1 μ M: $p<0,05$; 10 μ M: $p<0,01$; Figura 34C).

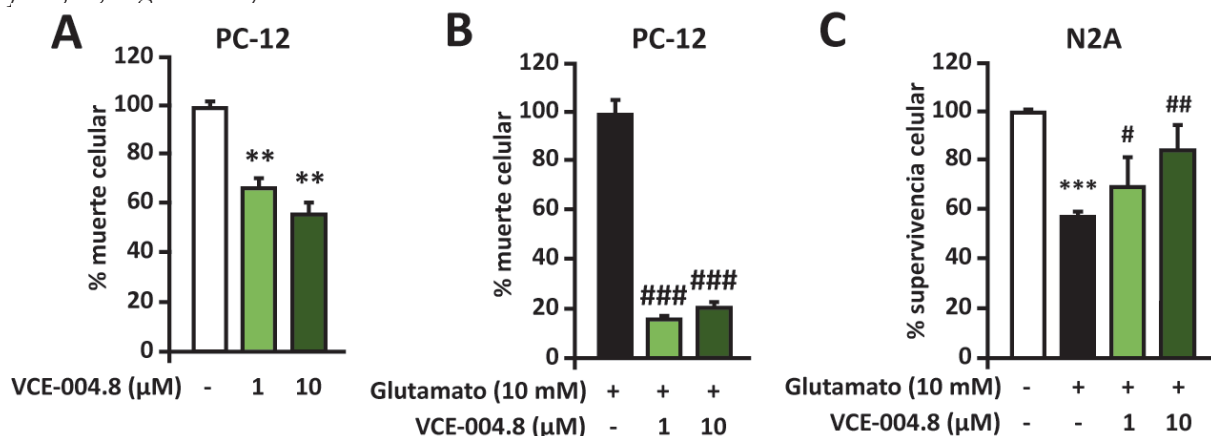


Figura 34. El compuesto VCE-004.8 es neuroprotector en condiciones basales y de excitotoxicidad inducida por glutamato a las 24 horas. La muerte celular se determinó como la liberación de LDH y se calculó como un porcentaje, tomando como 100% la muerte neuronal basal (A y C), o bien la muerte celular inducida por glutamato en ausencia de VCE-004.8 (B), determinada mediante MTT. Los datos representan la media \pm SEM, de dos experimentos por cuadruplicado (A y B), y tres experimentos independientes por triplicado (C). Para determinar la significancia estadística, se utilizó el test no paramétrico U-Mann Whitney. ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ vs CTL; # $p<0,05$ ## $p<0,01$ ### $p<0,001$ vs glutamato.

Asimismo, se realizaron cultivos primarios de microglía de rata, y se estudió la liberación de PGE_2 al sobrenadante tras un estímulo inflamatorio con LPS (10 ng/ml) durante 18 horas, y el efecto del pretratamiento con VCE-004.8 (15 minutos antes) sobre dicha liberación (Figura 35). VCE-004.8 redujo significativamente de manera dosis-dependiente la liberación de PGE_2 , determinada por ELISA.

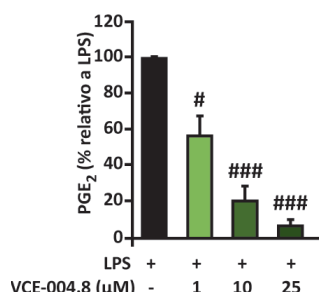


Figura 35. VCE-004.8 reduce significativamente y de manera dosis-dependiente la liberación de PGE_2 . El pretratamiento con VCE-004.8 fue efectivo en reducir los niveles de PGE_2 tras inducir el estímulo inflamatorio con LPS (10 ng/ml) durante 18 horas en sobrenadantes de cultivos primarios de microglía. Los resultados se relativizaron al grupo LPS como 100% de liberación de PGE_2 . Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron estadísticamente con el test paramétrico *t*-Student. # $p<0,05$ ### $p<0,001$ vs LPS.

2.2. VCE-004.8 mejora el deterioro neurológico en el modelo de TMEV-IDD

Se indujo el modelo de TMEV-IDD en los ratones SJL/J, y en el momento en que todos los animales mostraron deficiencias motoras (64 dpi), recibieron el tratamiento durante 14 días, que dependió del grupo, esto es, con vehículo (por vía intraperitoneal), con VCE-004.8 (10 mg/kg, por vía intraperitoneal), o con DMF (15 mg/kg, oralmente mediante una sonda intragástrica). Las pruebas motoras se realizaron el último día de experimento (78 dpi). Los parámetros del actímetro mostraron una disminución significativa de la actividad motora horizontal y vertical de los animales infectados tratados con vehículo respecto a los animales Sham ($p<0,05$), que era recuperada significativamente tanto en los animales tratados con VCE-004.8 ($p<0,01$), como en los tratados con DMF ($p<0,01$) (Figura 36B). El tratamiento con VCE-004.8 ejerció el mismo efecto respecto a la

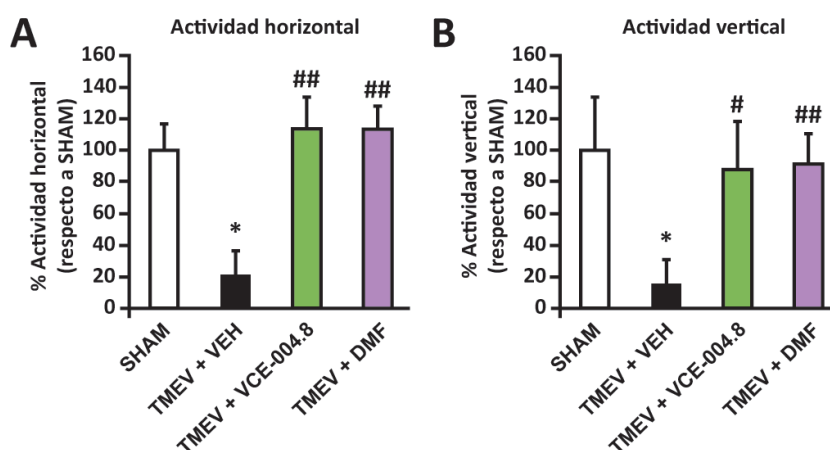


Figura 36. El tratamiento con el compuesto VCE-004.8 (10 mg/kg) mejora la disfunción motora observada en los ratones infectados con el virus de Theiler. La prueba del actímetro mostró una reducción significativa de la actividad exploratoria horizontal (A) y de la actividad vertical (B) de los animales a los 78 dpi. El tratamiento con VCE-004.8 recuperó la actividad motora de los ratones a niveles de animales Sham, al igual que el DMF (15 mg/kg). El tamaño muestral por grupo fue $n=6$. Los datos se muestran como la media \pm SEM, y la significancia estadística se obtuvo aplicando a los datos la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. * $p<0,05$ ** $p<0,01$ vs SHAM; # $p<0,05$ ## $p<0,01$ vs TMEV+VEH.

actividad vertical ($p < 0,05$), es decir, las medidas fueron similares a los animales Sham. De esta manera, el compuesto VCE-004.8 mostró una eficacia similar al DMF, aunque la vía de administración fuera diferente.

Posteriormente, se procedió con el análisis del tejido. El estudio histopatológico de la actividad microglial en las secciones de médula espinal a nivel torácico-lumbar (Figura 37C) mostró un aumento del marcaje Iba1 en animales infectados tratados con vehículo ($p < 0,001$), que se reducía significativamente con el tratamiento con el compuesto VCE-004.8 ($p < 0,001$, Figura 37D). Asimismo, se observó un aumento del número de infiltrados celulares en el parénquima nervioso en los animales infectados tratados con vehículo ($p < 0,001$), así como de linfocitos T CD4 ($p < 0,001$). En ambos casos, el tratamiento con VCE-004.8 disminuyó los infiltrados celulares en parénquima, siendo significativa la reducción del número de linfocitos T CD4 ($p < 0,001$; Figura 37B y F).

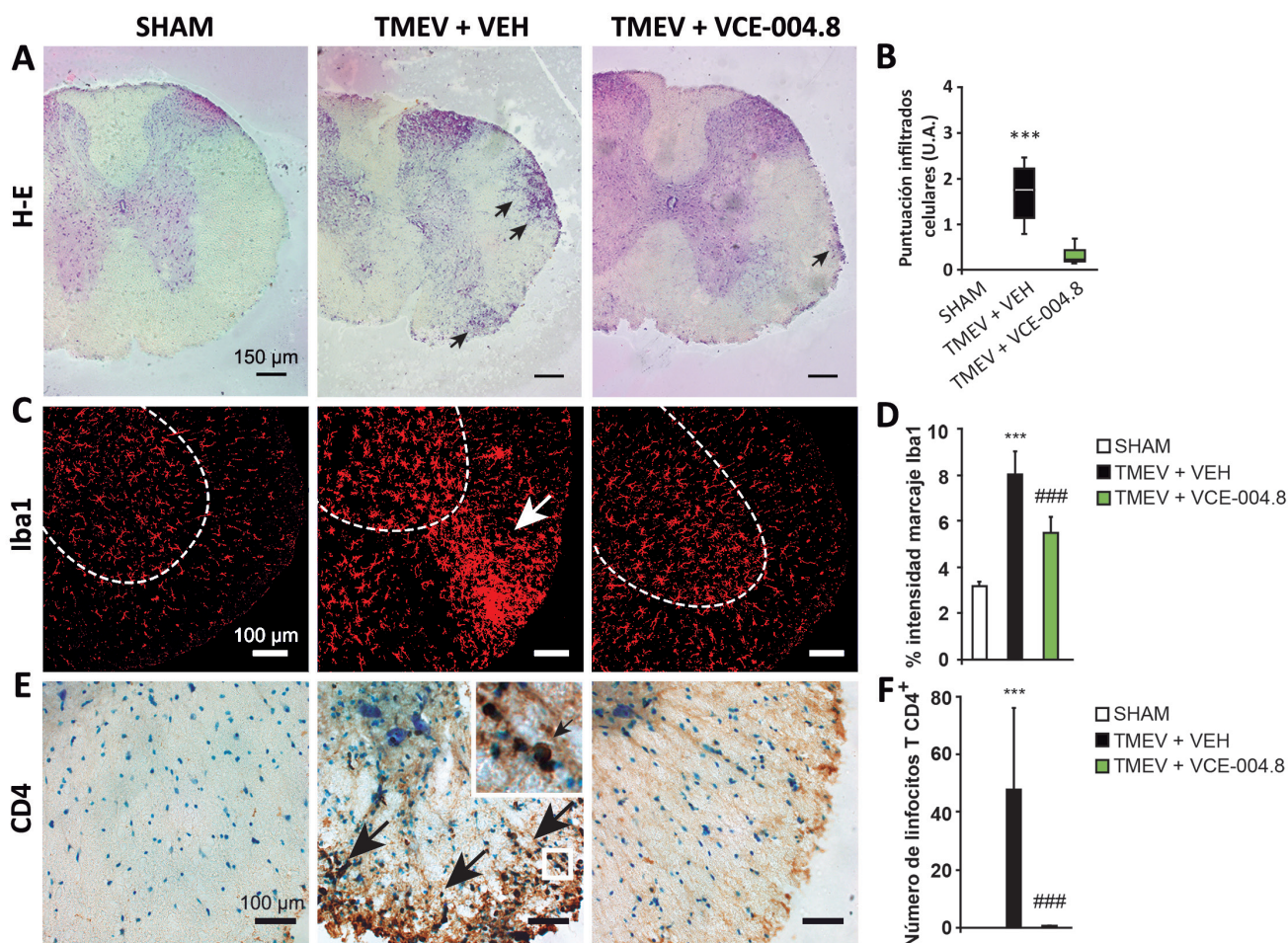


Figura 37. El compuesto VCE-004.8 reduce significativamente los niveles de infiltración celular y reactividad microglial en animales TMEV-IDD. Imágenes representativas del tejido de 30 μm de grosor, en el que se han realizado la tinción con H-E (A), inmunofluorescencia con anti-Iba1 (C) e inmunohistoquímica con anti-CD4 (E). El tratamiento con VCE-004.8 redujo significativamente el número de linfocitos T CD4 (F), marcó una tendencia a la baja en el número de infiltrados celulares (B), y provocó un descenso significativo de la reactividad microglial (D). Las cuantificaciones se muestran como la media \pm SEM, y se determinó la significancia mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. *** $p < 0,001$ vs SHAM; ### $p < 0,001$ vs TMEV+VEH. Barra de escala: 150 μm (A), 100 μm (C y E).

En relación a la desmielinización, la tinción de CryoMyelin descubrió áreas de desmielinización en las astas ventrales de las secciones de médula espinal de animales tratados con vehículo, características de este modelo, que estaban disminuidas en las secciones de animales tratados con VCE-004.8 (Figura 38).

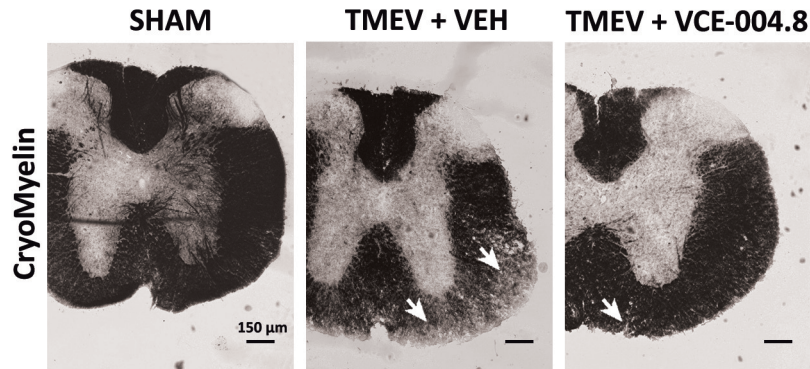


Figura 38. El tratamiento con VCE-004.8 revierte la desmielinización observada en la médula espinal de animales infectados con el virus de Theiler. Imágenes de la tinción con el kit CryoMyelin, en las que se aprecian áreas desmielinizadas (flechas). Barra de escala: 150 µm.

Para analizar si existían cambios en la cuantificación del daño axonal de los animales infectados tratados con vehículo, se recurrió a la tinción de los axones marcando con un anticuerpo contra neurofilamento H (Figura 39A). Se observó que los animales infectados con TMEV mostraban en la médula espinal una pérdida de la organización de los axones, que sin embargo se preservaba en la médula espinal de los ratones sometidos al tratamiento con VCE-004.8 ($p < 0,001$; Figura 39B).

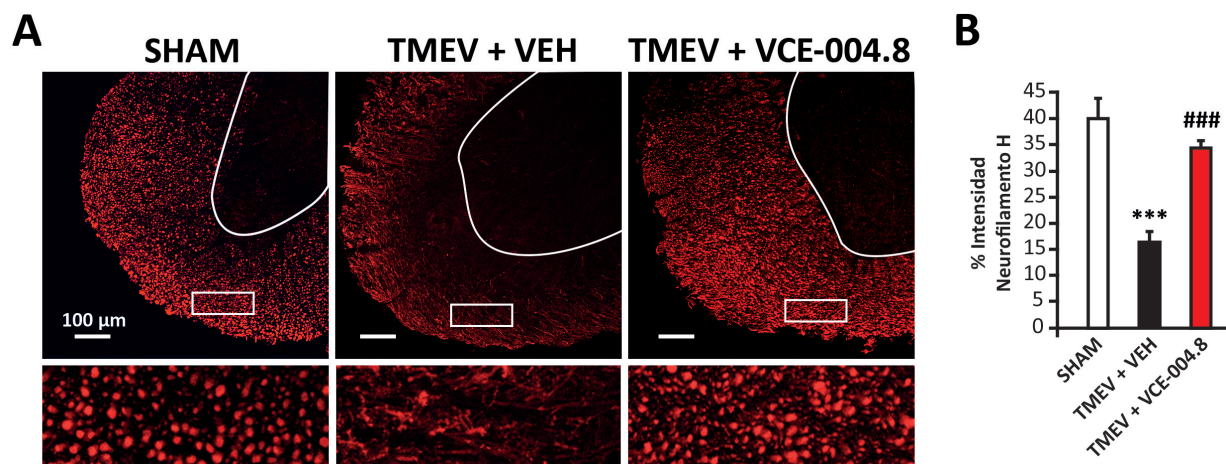


Figura 39. VCE-004.8 previene significativamente la pérdida axonal en animales TMEV-IDD. (A) Imágenes representativas de cortes transversales de médula espinal torácico-lumbar de 30 µm de grosor, en los que se ha realizado la tinción de inmunofluorescencia con anti-neurofilamento H. Se analizó el marcaje en sustancia blanca de astas ventrales de médula espinal torácica-lumbar, de al menos 5 secciones por animal. Los datos de la cuantificación (B) se muestran como la media \pm SEM, y se determinó la significancia mediante la prueba no paramétrica de U-Mann Whitney. *** $p < 0,001$ vs TMEV+VEH; ### $p < 0,001$ vs EAE+VEH. Barra de escala: 100 µm.

2.3. VCE-004.8 reduce el deterioro neurológico en el modelo de EAE

Para investigar si el efecto beneficioso del compuesto VCE-004.8 en el modelo de EM de etiología viral se reproducía en el modelo de etiología autoinmune, se realizó el experimento con el modelo de EAE. Se inmunizó a los animales con MOG₃₅₋₅₅, y tras la aparición de los primeros síntomas motores a día 7 pI (Figura 40), los animales empezaron a recibir el tratamiento correspondiente, ya fuera vehículo (mediante inyección intraperitoneal), VCE-004.8 (10 mg/kg, también por vía intraperitoneal), o bien DMF (15 mg/kg, de forma oral por vía intragástrica), durante 21 días consecutivos. Los animales fueron pesados periódicamente y se les asignó una puntuación clínica según su grado de discapacidad neurológica.

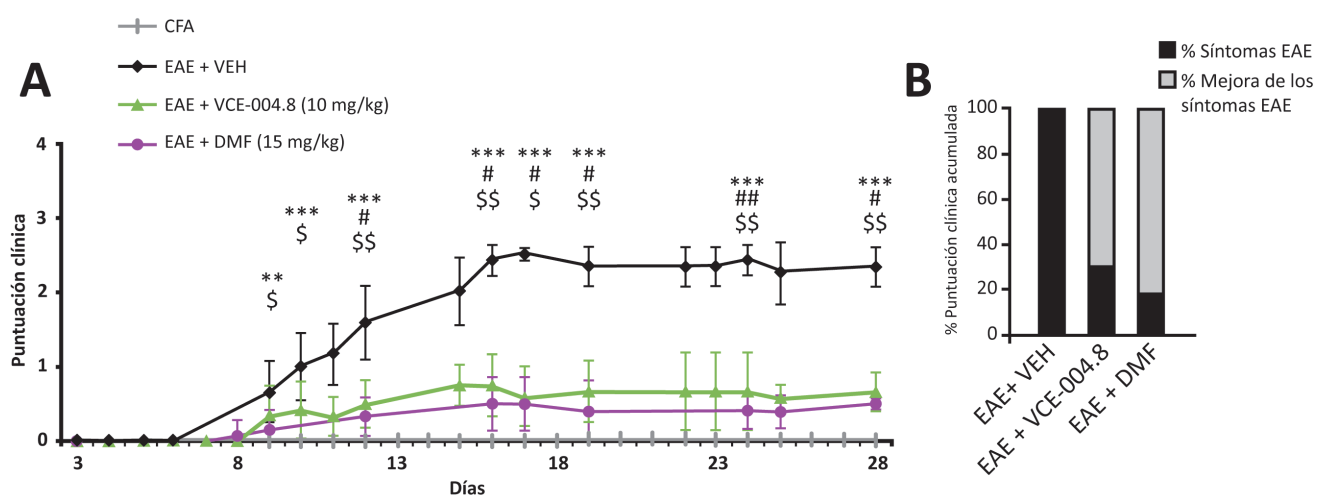


Figura 40. VCE-004.8 mejora significativamente los signos clínicos característicos del modelo de EAE (A). La puntuación clínica acumulada (B) se determinó sumando los valores obtenidos por todos los ratones dentro del mismo grupo, y relativizándolos a los obtenidos en el grupo EAE+VEH (100%). El tamaño muestral de los grupos fue el siguiente: CFA, EAE+VEH y EAE+VCE-004.8, n=6; EAE+DMF, n=5. Los datos se muestran como la media \pm DEM, y la significancia estadística se obtuvo aplicando a los datos la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ EAE+VEH vs CFA; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ EAE+VCE-004.8 vs EAE+VEH; § $p < 0,05$ §§ $p < 0,01$ EAE+DMF vs EAE+VEH.

Los ratones que recibieron vehículo alcanzaron su máximo grado de severidad a los 17 dpI ($p < 0,001$; Figura 40A). Alguno de los ratones llegó a mostrar signos de paraparesia leve (puntuación clínica levemente superior a 2,5). En el caso de los animales inmunizados tratados con VCE-004.8, mostraron una sintomatología leve de manera estable a lo largo del experimento, paresia parcial de la cola ($p < 0,05$ el último día de experimento). Los ratones inmunizados tratados con DMF no mostraron un empeoramiento en su sintomatología respecto a los tratados con vehículo ($p < 0,01$ a la conclusión del experimento), de manera análoga a la sintomatología observada tras el tratamiento con VCE-004.8 (Figura 40A). La mejora en la sintomatología después de la administración de VCE-004.8 o DMF se hace incluso más evidente si observamos la gráfica de la puntuación clínica acumulada (Figura 40B).

El estudio histopatológico del tejido reveló que el aumento significativo en la actividad microglial en secciones de médula espinal de animales inmunizados tratados con vehículo ($p<0,001$), era revertido significativamente en animales tratados con VCE-004.8 ($p<0,05$; Figura 41D). El incremento de infiltrados celulares en parénquima en las secciones de animales inmunizados tratados con vehículo ($p<0,001$; Figura 41B), así como de linfocitos T CD4 ($p<0,001$; Figura 41F), se vio reducido drásticamente en los animales inmunizados tratados con VCE-004.8, tanto en infiltrados celulares ($p<0,05$) como en linfocitos T CD4 ($p<0,001$, Figura 41B y F).

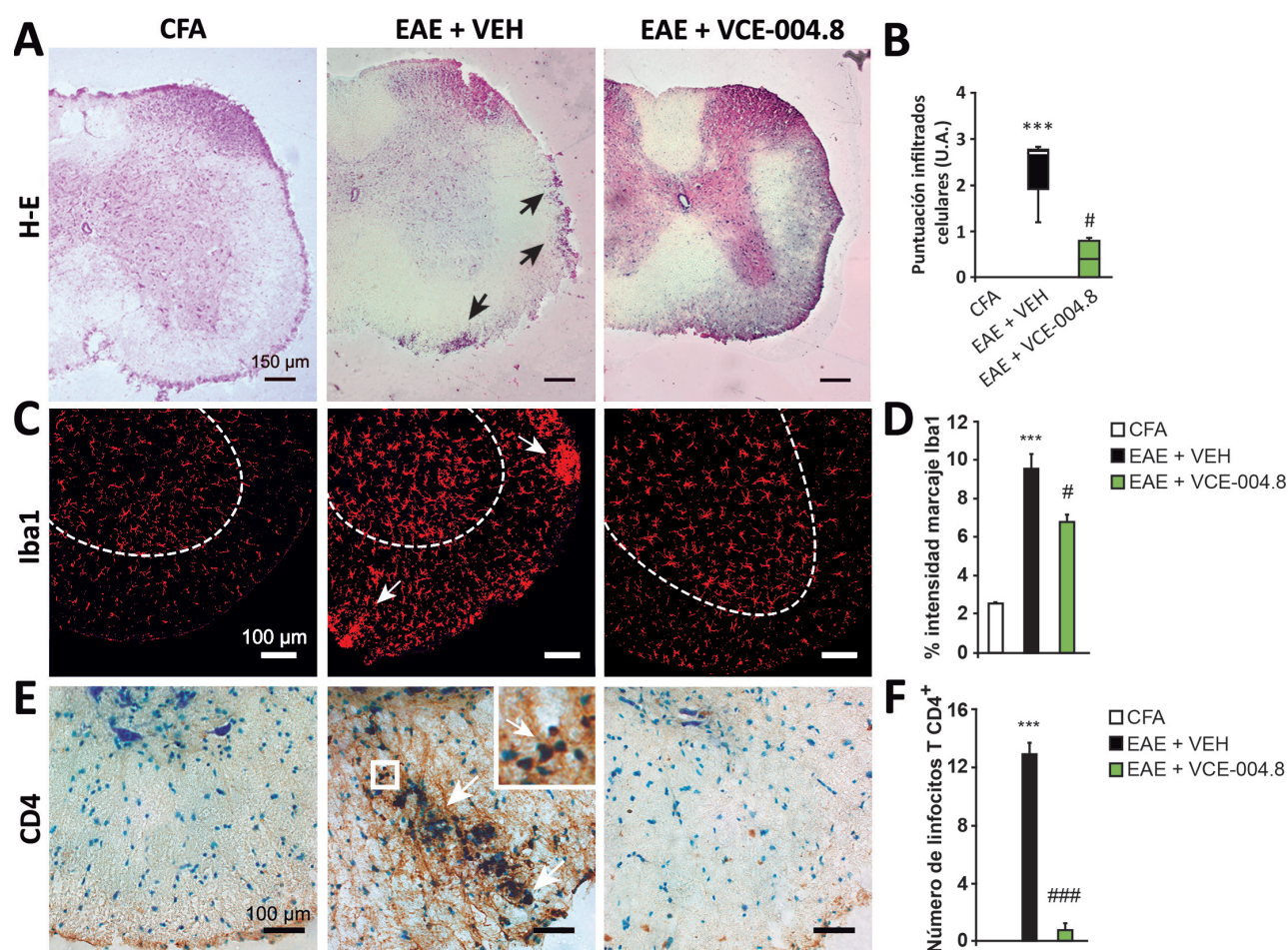


Figura 41. VCE-004.8 reduce significativamente los niveles de infiltración celular y reactividad microglial en animales EAE. Imágenes representativas de cortes transversales de médula espinal torácico-lumbar de 30 μ m de grosor, en los que se han realizado la tinción con H-E (A), inmunofluorescencia con anti-Iba1 (C) e inmunohistoquímica con anti-CD4 (E). El tratamiento con VCE-004.8 redujo significativamente el número de infiltrados celulares (B, flechas) y de linfocitos T CD4 (F), e indujo un descenso significativo de la reactividad microglial (D). Las cuantificaciones se muestran como la media \pm SEM, y se determinó la significancia mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. *** $p<0,001$ vs CFA; # $p<0,05$ #### $p<0,001$ vs EAE+VEH. Barra de escala: 150 μ m (A), 100 μ m (C y E).

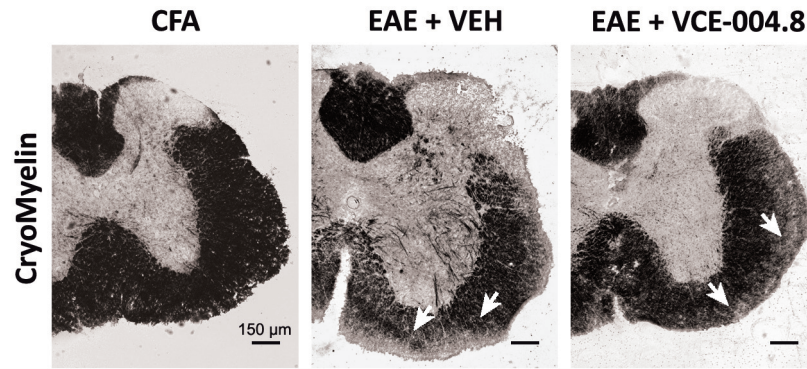


Figura 42. El tratamiento con VCE-004.8 reduce la desmielinización observada en la médula espinal de animales que desarrollan EAE. Imágenes de la tinción con el kit CryoMyelin, en las que se aprecian áreas desmielinizadas (flechas). Barra de escala: 150 µm.

En los análisis histopatológicos sobre el grado de desmielinización, las áreas desmielinizadas observadas en los animales que recibieron vehículo (Figura 42) se redujeron levemente en los animales tratados con VCE-004.8. En lo que concierne a la degeneración axonal, las imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra neurofilamento H mostraron un daño axonal prominente en la sustancia blanca de la médula espinal de los ratones que recibieron vehículo, mientras que los animales tratados con VCE-004.8 revelaron una mejor estructuración de los paquetes axonales y una mayor señal en el marcaje de neurofilamento H ($p < 0,001$; Figura 43B).

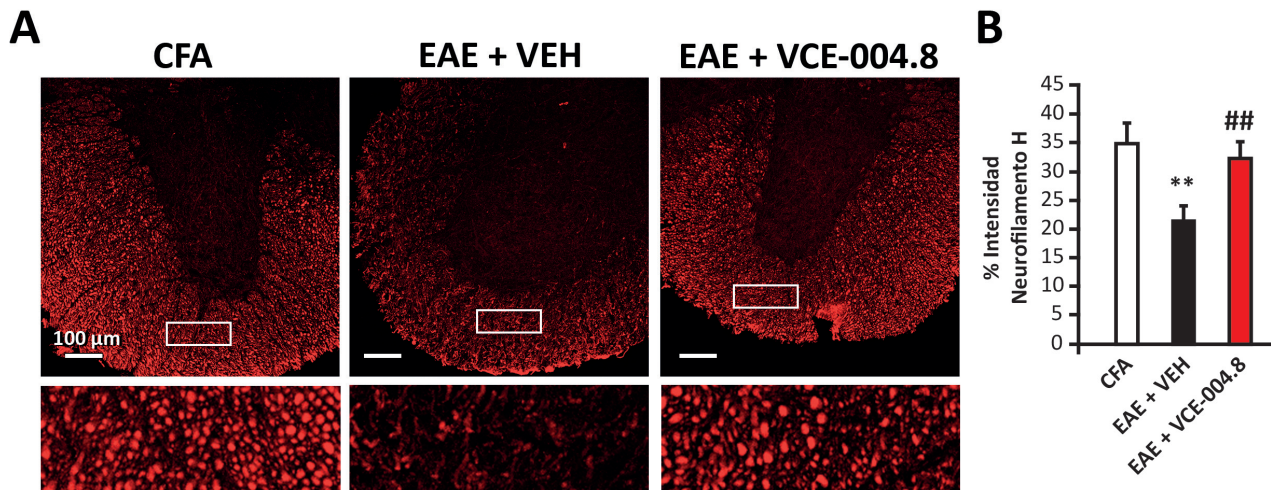


Figura 43. El compuesto VCE-004.8 reduce significativamente la pérdida axonal en animales con EAE. (A) Imágenes representativas de cortes transversales de médula espinal torácico-lumbar de 30 µm de grosor, en los que se ha realizado la tinción de inmunofluorescencia con anti-neurofilamento H. Se analizó el marcaje en sustancia blanca de astas ventrales de médula espinal torácica-lumbar, de al menos 5 secciones por animal, y 5 animales por grupo. La cuantificación (B) se muestra como la media \pm SEM, y se determinó la significancia mediante la prueba no paramétrica de U-Mann Whitney. ** $p < 0,01$ vs CFA; ## $p < 0,01$ vs EAE+VEH. Barra de escala: 100 µm.

V. *Discusión*

Durante mucho tiempo, incluida la mayor parte del pasado siglo, el único tratamiento que existía para los pacientes de EM era el uso de corticoesteroides durante los brotes, que ejercían una mejora corta y efectiva de los síntomas, pero no eran viables como tratamiento a largo plazo. En la segunda mitad del siglo XX se intensificó la investigación en la búsqueda de terapias inmunomoduladoras e inmunosupresoras, que inhibían componentes del sistema inmune causando, a veces, una disfunción generalizada de dicho sistema. En la década de los 90, se aprobaron dos clases de agentes inmunomoduladores pero no inmunosupresores, el IFN β y el AG para el tratamiento de la EM-RR. Son fármacos capaces de disminuir la actividad de la enfermedad mediante acciones pleiotrópicas, aunque en el caso del IFN β todavía no se han esclarecido totalmente.

Además, en los últimos años han surgido otras terapias que también tienen como diana terapéutica al sistema inmune, y que resultan efectivas para el tratamiento de la EM, como el anticuerpo monoclonal humanizado natalizumab (Tysabri®), que inhibe la entrada de leucocitos al SNC, o terapias nuevas administradas por vía oral como el fingolimod (Gilenya®; Scott, 2011), que impide la salida de linfocitos activados de los ganglios linfáticos; o el DMF (Tecfidera®), que disminuye el estrés oxidativo (Deeks, 2016). Otras terapias de uso reciente incluyen la teriflunomida, que inhibe la síntesis *de novo* del ADN (Gold y Wolinsky, 2011), o los anticuerpos monoclonales humanizados, entre ellos el alemtuzumab (Coles y cols., 2012), que induce la depleción de linfocitos B y T, o el ocrelizumab, que tiene como diana los linfocitos B maduros (para más información, consultar la revisión de Straus Farber y cols., 2016).

A pesar de todos estos avances, hay que decir que los efectos de algunos tratamientos sobre el sistema inmune pueden aumentar el riesgo de padecer cáncer e infecciones (Domínguez-Mozo y cols., 2016). Por otro lado, la respuesta de los pacientes a los tratamientos no es uniforme, por lo que resulta muy positiva la existencia de un abanico de tratamientos terapéuticos que permitan la opción de terapias alternativas personalizadas.

Como se ha comentado, la mayoría de los tratamientos para la EM tienen como diana al sistema inmune. En este contexto, el perfil antiinflamatorio de los cannabinoides podría resultar altamente beneficioso como tratamiento para esta enfermedad. En los últimos años, la investigación sobre los cannabinoides como agentes terapéuticos en los diferentes modelos murinos de EM ha ido en aumento. Entre los fitocannabinoides utilizados, cabe destacar el THC (Lyman y cols., 1989; Wirguin y cols., 1994; Baker y cols., 2000; Maresz y cols., 2007), CBD (Kozela y cols., 2011; Mecha y cols., 2013b; Giaccoppo y cols., 2015), y la mezcla de ambos en el fármaco Sativex® (Feliú y cols., 2015; Moreno-Martet y cols., 2015). También se han investigado cannabinoides sintéticos, como WIN55,212-2 (Arévalo-Martín y cols., 2003; Croxford y Miller, 2003; Pryce y cols., 2003; Ni y cols., 2004; Mestre y cols., 2009; Hasseldam y Johansen, 2010; De Lago y cols., 2012) y HU-210

(Docagne y cols., 2007); endocannabinoides como AEA (Mestre y cols., 2011), 2-AG (Lourbopoulos y cols., 2011) y PEA (Loría y cols., 2008); inhibidores de la recaptación de AEA (Mestre y cols., 2005; Ortega-Gutierrez y cols., 2005; Loría y cols., 2010), e inhibidores de la degradación de 2-AG (Hernández-Torres y cols., 2014; Bernal-Chico y cols., 2015).

Parte de los compuestos derivados de los fitocannabinoides utilizados en esta tesis doctoral resultan prometedores para un futuro uso como agentes terapéuticos en EM, en especial el derivado de CBG, VCE-003, y el derivado de CBD, VCE-004.8, gracias a la mejora en la afinidad por los receptores CB2 y PPAR γ , respecto a los fitocannabinoides de los que provienen.

1. Eficacia terapéutica del derivado del fitocannabinoide cannabigerol, VCE-003

Comenzamos el estudio investigando las características del VCE-003, en cuanto a sus posibles dianas celulares y sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y neuroprotectoras *in vitro*. Finalmente investigamos su potencial terapéutico en dos modelos de EM bien establecidos, TMEV-IDD y EAE.

El CBG presenta una baja afinidad por los receptores CB2 y PPAR γ , mientras que el compuesto VCE-003 exhibe una importante mejora en su capacidad de activar ambos receptores. Se sabe que en el SNC el receptor CB2 está presente en bajos niveles en el individuo sano, pero incrementa su expresión en situaciones patológicas (Maresz y cols., 2005; Benito y cols., 2003; 2008). En esta línea, diversos estudios han mostrado una sobreexpresión del receptor CB2 en microglía. Así, Cabral y Marciano-Cabral en 2005 describieron que en un modelo de activación secuencial de la microglía, la expresión del receptor CB1 era constitutiva, mientras que la expresión del receptor CB2 era inducible y dependía del grado de activación celular. En estudios con tejido *post mortem* de pacientes con EM, se ha observado la expresión del receptor CB2 en microglía, linfocitos y astrocitos en las placas activas de desmielinización en la periferia de las placas crónicas en cerebro (Yiangou y cols., 2006; Benito y cols., 2007). Respecto al receptor PPAR γ , es importante señalar que se postuló como una prometedora diana terapéutica en EM en base a estudios en los que se administraban activadores clásicos de dicho receptor (Feinstein y cols., 2002; Klotz y cols., 2009). Además, en los últimos años el receptor PPAR γ ha cobrado importancia por sus propiedades inmunorreguladoras y neuroprotectoras en diversas patologías del SNC (Pisanu y cols., 2014; Feliú y cols., 2015). De especial interés para nuestro trabajo son las observaciones sobre un aumento de su expresión en médula espinal de ratones en el modelo de EAE (Diab y cols., 2002) y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM (Szalardy y cols., 2013).

En lo que respecta a la neuroinflamación, diversos trabajos han descrito las propiedades antiinflamatorias del CBG. Concretamente, el efecto del CBG se ha asociado a la modulación de los niveles de las citoquinas IL-1 β , IL-10 e IFN γ , y a la disminución de la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico en un modelo murino de colitis (Borrelli y cols., 2013), a través de la activación del receptor CB2. Estudios más antiguos describieron también que el CBG reducía la liberación de PGE $_2$ en cultivos de células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (Barrett y cols., 1985). Más recientemente, el trabajo de Valdeolivas y cols. (2015) ha descrito el efecto neuroprotector, antiinflamatorio y antioxidante del CBG en un modelo murino de la enfermedad de Huntington.

En nuestro estudio con células microgliales, se puso de manifiesto la mayor capacidad del

compuesto VCE-003 de disminuir la liberación de citoquinas proinflamatorias tras un estímulo de LPS respecto al CBG, corroborando el aumento en la afinidad que exhibe por los receptores CB2 y PPAR γ , cuya activación se ha relacionado con la modulación de la función de la microglía (Mecha y cols., 2015). Además, VCE-003 redujo la expresión de iNOS, un marcador clásico de inflamación, a través de la activación de ambos receptores, disminuyendo la liberación de nitritos. En otros estudios *in vitro* se ha descrito un efecto similar, puesto que el tratamiento con algunos cannabinoides, que incluyen agonistas sintéticos del receptor CB1 o endocannabinoides, redujo la liberación de especies reactivas de nitrógeno en microglía, macrófagos e incluso en astrocitos, con la implicación de los receptores CB1 y CB2 (Waksman y cols., 1999; Molina-Holgado y cols., 2002; Ehrhart y cols., 2005; Mestre y cols., 2005). Además, el tratamiento con diferentes cannabinoides conduce a un descenso en la expresión de iNOS en modelos experimentales de distintas patologías, incluida la EM (Mestre y cols., 2005; Ruiz-Valdepeñas y cols., 2011; Borrelli y cols., 2013; Ma y cols., 2015).

Otro de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido la evaluación *in vitro* del potencial neuroprotector de los nuevos derivados de fitocannabinoides. Es bien conocido que el mantenimiento de la homeostasis del calcio intracelular es indispensable para la supervivencia neuronal (Gwag y cols., 1999; Sattler y Tymiansky, 2000), al igual que la regulación del metabolismo del glutamato, cuyo incremento en su concentración extracelular se ha relacionado con la muerte celular de neuronas y de oligodendrocitos (Molina-Holgado y cols., 2003; Park y cols., 2004). Además, se han descrito niveles altos de glutamato en lesiones activas de EM, y se han asociado con el componente neurodegenerativo de la EM (Pitt y cols., 2000; Werner y cols., 2001; Groom y cols., 2003). El compuesto VCE-003 disminuye la muerte neuronal inducida por la entrada de calcio a la célula mediante la aplicación de un ionóforo de calcio, así como por la administración directa de glutamato a las neuronas. Estos resultados van en la misma línea de otros estudios, que demuestran el efecto neuroprotector de agonistas cannabinoides frente a excitotoxicidad (Shen y Thayer, 1998; Loría y cols., 2010).

Una consecuencia de la excitotoxicidad por glutamato es la inducción de estrés oxidativo a través de diferentes vías, como por ejemplo la activación de genes inducibles, que incluyen COX-2, iNOS o moléculas de adhesión (Gilgun-Sherki y cols., 2002; Parathath y cols., 2006). A su vez, las ROS generadas potencian la actividad del glutamato, induciendo más ROS, entrando así en un bucle de excitotoxicidad. La toxicidad inducida por glutamato puede prevenirse con antioxidantes (De Bock y cols., 2012). Se ha demostrado que algunos cannabinoides contrarrestan la producción de ROS, disminuyendo los efectos neurotóxicos (Gallily y cols., 2000; Horváth y cols., 2012), y ejerciendo efectos antioxidantes (Hampson y cols., 1998; Marsicano y cols., 2002). En este contexto, quisimos investigar si, además de actuar como neuroprotector, el compuesto VCE-003 promovía

la ruta de Nrf2, que es crítica en la respuesta celular frente a daño oxidativo. En la mayoría de las líneas celulares estudiadas, entre las que se encuentran líneas de glioma, neuroblastoma, riñón y feocromocitoma, VCE-003 es capaz de promover la transcripción de Nrf2, evidenciando que la mejora de afinidad por los receptores CB2 y PPAR γ puede conducir a un efecto antioxidante superior al producido por CBG.

Como se ha comentado, la excitotoxicidad por glutamato induce estrés oxidativo y aumenta la producción de ROS. Los radicales libres, como el anión superóxido (O_2^-) o el óxido nítrico, son capaces de alterar la BHE, un proceso relacionado con el daño oxidativo que comparten enfermedades como Alzheimer y EM (Kim y cols., 2003; Rosell y cols., 2006). El daño oxidativo induce la sobreexpresión de MMPs, afectando al ensamblaje de las proteínas de uniones estrechas, como ocludinas, claudinas y ZO-1 (Gursoy-Ozdemir y cols., 2004), al igual que las uniones adherentes (Rao y cols., 2002). Todas estas variaciones llevan a un aumento en la permeabilidad de la BHE frente a ciertas moléculas inflamatorias de alto peso molecular, como las citoquinas, y además favorece la entrada de leucocitos (Haorah y cols., 2007).

Son numerosos los trabajos que han demostrado el papel de las moléculas de adhesión en el desarrollo de la respuesta inmune en el SNC, y la implicación de éstas en la progresión de la EM, siendo característica de esta enfermedad la formación de lesiones focales inflamatorias en el SNC, compuestas por cúmulos de infiltrados perivascuales (Bö y cols., 1996; Yusuf-Makagiansar y cols., 2002; Zameer y Hoffman, 2003; Miller y cols., 2003; Eikelenboom y cols., 2005; Chaudhary y cols., 2006; McFarland y Martin, 2007; Mestre y cols., 2009; 2011; Sellner y cols., 2013; Haarmann y cols., 2015). Las moléculas de adhesión están sobreexpresadas en EM, en particular VCAM-1 (Greenwood y cols., 2011). En los modelos animales de EM se ha constatado que VCAM-1 no se expresa constitutivamente en SNC, sino que lo hace tras la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ o después de la infección con el virus de Theiler. Hay estudios que indican que las moléculas de adhesión están involucradas en el reclutamiento de células inmunes en condiciones inflamatorias no autoinmunes en el SNC, como en lesiones de médula espinal (Farooque y cols., 1999) e ictus (Connolly y cols., 1996).

En este sentido, el tratamiento con VCE-003 reduce de manera dosis-dependiente los niveles de sVCAM-1 en los sobrenadantes de cultivos de células endoteliales cerebrales murinas, y este efecto es bloqueado por los antagonistas de los receptores CB2 y PPAR γ , si bien no se observan acciones aditivas o sinérgicas cuando se bloquean ambos receptores simultáneamente. De manera que podemos proponer que en las acciones del compuesto VCE-003 sobre VCAM-1, participan los receptores CB2 y PPAR γ , aunque desconocemos los mecanismos de interacción de ambos receptores. Estudios anteriores de nuestro laboratorio mostraron que un endocannabinoide como la

AEA disminuía los niveles de VCAM-1 y consecuentemente inhibía la migración de leucocitos en un modelo *in vitro* de BHE (Mestre y cols., 2011) a través de la activación del receptor CB1, pero existen evidencias adicionales que señalan la importancia del receptor CB2 en la funcionalidad de la BHE (Ramírez y cols., 2012). De especial interés en este contexto son las observaciones sobre la regulación al alza del receptor CB2, en células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana en condiciones de daño inflamatorio (Ramírez y cols., 2012). En este mismo estudio se constató mediante microscopía intravital que agonistas del receptor CB2 atenuaban la adhesión de los leucocitos en los vasos superficiales de la pia madre, en un modelo de encefalitis por administración de LPS.

Por otro lado, el promotor del gen VCAM-1 posee un dominio de unión del factor nuclear NFκB (Collins y cols., 1995; Lim y cols., 2012). En condiciones basales, NFκB se localiza en forma inactiva en el citoplasma de la célula, donde permanece unido a proteínas inhibitorias IκB. Diferentes estímulos extracelulares pueden inducir la fosforilación de IκB, permitiendo su degradación por el proteasoma y la liberación de NFκB que se transloca al núcleo, donde se une a elementos específicos del ADN (Baldwin, 1996). Durante un proceso inflamatorio, esta unión provoca una potenciación en la transcripción de VCAM-1, favoreciendo la captación y migración de linfocitos al parénquima nervioso (Collins y cols., 1995). En células endoteliales cerebrales, el compuesto VCE-003 tiende a reducir la fosforilación de IκB a los 5 minutos del estímulo cuando lo evaluamos por Western blot. Además, los resultados que obtuvimos mediante el análisis de la inmunocitoquímica en las células endoteliales confirman que se produce un retraso en la translocación de p65 al núcleo. En otros tipos celulares como las células HUVEC, la estimulación con linfotóxina A (un miembro de la familia de TNFα) induce el pico de translocación de p65 al núcleo 15 minutos después del estímulo (Suna y cols., 2008). Es posible que esta variación en el tiempo de translocación se deba a diferencias en cuanto a la línea celular y/o al estímulo inflamatorio utilizados.

En la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión puede estar involucrada la activación de otros receptores distintos a CB1 y a CB2, como el receptor nuclear PPARγ (Pasceri y cols., 2000), en concordancia con los resultados observados con el compuesto VCE-003. A favor de la participación de PPARγ en dicha regulación existen diversos estudios. El más significativo describe que la activación constitutiva de PPARγ utilizando un adenovirus suprime las moléculas de adhesión proinflamatorias en células endoteliales humanas (Wang y cols., 2002). En otro estudio, la activación de PPARγ inhibe la activación de NFκB en células endoteliales, influyendo en la regulación a la baja de la transcripción de los genes ICAM-1 y otros genes relacionados con la respuesta inflamatoria (Collins y Cybulsky, 2001).

Por otra parte, una de las características de la EM y de sus modelos animales es la desmielinización y el daño a las células oligodendrogliales. En este contexto, agonistas cannabinoides como el endocannabinoide 2-AG, participan en la diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros *in vitro* (Gómez y cols., 2010; 2011; 2015). En nuestro estudio, quisimos valorar si VCE-003 podría tener algún efecto sobre la diferenciación de los oligodendrocitos. Los resultados obtenidos indican que ni el CBG, ni su derivado VCE-003, favorecen la maduración de los oligodendrocitos en cultivo.

Tras haber clarificado, al menos en parte, el perfil biológico de VCE-003, en cuanto a su capacidad antiinflamatoria y neuroprotectora *in vitro*, procedimos a la valoración de su eficacia terapéutica, administrándolo tras la aparición de la sintomatología en fase terapéutica, en los dos modelos de EM, EAE y TMEV-IDD.

El tratamiento con VCE-003 redujo la severidad clínica en el modelo de EAE a través de la activación de los receptores CB2 y PPAR γ , y mejoró la función motora valorada mediante la actividad vertical en el modelo de TMEV-IDD. Además, en el estudio histopatológico realizado, se observó que VCE-003 ejercía acciones antiinflamatorias en los dos modelos de EM, valorado mediante el descenso de la reactividad microglial, cuya activación crónica se ha descrito como un factor patogénico en numerosas enfermedades inflamatorias del SNC (Matsumoto y cols., 1992). De acuerdo con la disminución de la actividad microglial, observamos una reducción en la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IFN γ o IL-17. Si bien la fuente celular de estas citoquinas incluye no sólo a la microglía, sino también a los infiltrados leucocitarios, e incluso a los astrocitos (Rothhammer y Quintana, 2015). Además, observamos una reducción de la expresión génica de iNOS, corroborando los anteriores hallazgos *in vitro*.

Es posible que alguna de las acciones del VCE-003 estén mediadas, al menos en parte, por la activación del receptor CB2, ya que ello se asocia a la mayoría de los efectos que los cannabinoides pueden ejercer sobre el sistema inmune (Kaminski y cols., 1992), en especial reduciendo la liberación de mediadores proinflamatorios (Ehrhart y cols., 2005; Ashton y Glass, 2007). Hallazgos similares se han encontrado, por ejemplo, tras el tratamiento con el agonista cannabinoide del receptor CB2 JWH-015 (Croxford y Miller, 2003) o el agonista sintético de los receptores CB1 y CB2, WIN55,212-2 (Arévalo-Martín y cols., 2003), ambos descritos en el modelo de TMEV.

Como es bien conocido, las moléculas de adhesión son fundamentales para el reclutamiento de células inmunes en condiciones inflamatorias del SNC. En el ámbito de la EM, los fármacos que se administran para evitar el paso de linfocitos al SNC (Polman y cols., 2006; Cohen y cols., 2010) o que reducen el número de linfocitos de periferia (Coles y cols., 2012) suprimen la

tasa de brotes y la acumulación de lesiones por MRI. En esta línea, cabe recordar que en la actualidad se utiliza el tratamiento con natalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que inactiva VLA-4 (ligando de VCAM-1), como agente de segunda línea en EM. VLA-4 se expresa en linfocitos activados y linfocitos de memoria, además de en células dendríticas (Evans y cols., 2009).

El tratamiento con VCE-003 redujo significativamente la inducción de VCAM-1 en los modelos de TMEV-IDD y de EAE. Estos resultados concuerdan con la disminución de infiltrados celulares y linfocitos T CD4 que observamos en el parénquima nervioso, ya que una disminución en VCAM-1 normalmente conlleva una reducción en la trans migración leucocitaria. Los datos obtenidos sobre la expresión de VCAM-1 en esta tesis doctoral se ajustan a la evidencia de que algunos cannabinoides exhiben un efecto inhibitorio sobre la migración de linfocitos al parénquima nervioso en diferentes modelos murinos (Arévalo-Martín y cols., 2003; Mestre y cols., 2009; Zhao y cols., 2010; Ramírez y cols., 2012), lo que hace que el estudio de las moléculas de adhesión sea una de las prioridades cuando se investigan dianas terapéuticas en EM. En trabajos anteriores, nuestro grupo había observado que la administración del cannabinoide sintético WIN55,212-2 a ratones infectados con el virus de Theiler inhibía la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, interfiriendo con la progresión de la enfermedad (Mestre y cols., 2009), lo que incidía en el descenso en el número de infiltrados linfocitarios en el parénquima cerebral (Arévalo-Martín y cols., 2003), de acuerdo con los hallazgos obtenidos en el tratamiento con VCE-003 en los dos modelos utilizados de EM. La ventaja de VCE-003 sobre WIN55,212-2 radica en que no ejerce agonismo por el receptor CB1 y por lo tanto no presenta efectos psicoactivos, mientras que WIN55,212-2 es un potente activador del receptor CB1, aunque también activa CB2. Además, la inducción de apoptosis de linfocitos T encefalitogénicos puede ser otra causa de disminución de los infiltrados celulares en el parénquima nervioso, como se muestra en un interesante estudio con WIN55,212-2 en el modelo pasivo de EAE (Sánchez y cols., 2006). Publicaciones del pasado año que investigaron el efecto del Sativex® como tratamiento terapéutico demostraron un descenso en el número de infiltrados celulares en parénquima nervioso en el modelo de EAE (Moreno-Martet y cols., 2015) y una reducción linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, asociado a la inhibición de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en el modelo de TMEV (Feliú y cols., 2015).

En general hay consenso sobre el hecho de que en la EM existe una fase inicial donde toma mayor relevancia el componente inflamatorio, y posteriormente se desarrolla una fase en la que tiene mayor relevancia el componente neurodegenerativo con un daño acumulativo en los axones, lo que conlleva al incremento de la discapacidad y la pérdida de movilidad en los pacientes. Así, se ha llegado a proponer que la acumulación gradual de discapacidad en la EM-SP se debe a un proceso neurodegenerativo, manifestado como muerte neuronal, degeneración walleriana y astrogliosis, independientemente de la respuesta autoinmune característica de las fases iniciales de la enferme-

dad (Trapp y Nave, 2008). De acuerdo con este razonamiento, se han observado niveles anormalmente altos de glutamato en líquido cefalorraquídeo de pacientes de EM (Stover y cols., 1997). El incremento del glutamato extracelular podría explicar la muerte neuronal por excitotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas (Lewerenz y Maher, 2015). En el ámbito de la EM, durante los últimos años ha habido gran interés en el desarrollo de terapias que engloben acciones inmunomoduladoras y neuroprotectoras. Respecto al uso de los cannabinoides como fármacos con potencial eficacia en EM, cabe resaltar los numerosos estudios que describen su efecto neuroprotector en diferentes modelos animales, como el modelo de excitotoxicidad inducida por ácido kaínico (Maricano y cols., 2003), o la excitotoxicidad inducida por la activación de receptores AMPA (Loría y cols., 2010).

Hemos observado que el tratamiento con el compuesto VCE-003 favorece la preservación de las vainas de mielina; no sabemos a qué se debe este hecho aunque es posible que sea secundario a la reducción en la inflamación inducida por el tratamiento. Además, VCE-003 ejerce acciones neuroprotectoras, atenuando la desestructuración de los paquetes axonales y el daño axonal evaluado en secciones longitudinales y transversales de médula espinal. Ello podría ser también consecuencia tan sólo de la disminución en la neuroinflamación, pero los resultados en los experimentos *in vitro* muestran que por sí solo el tratamiento con VCE-003 disminuye la muerte neuronal tanto en cultivos primarios de neuronas como en líneas celulares. Es posible sugerir por tanto que lo que observamos en la médula espinal en relación al daño axonal en los modelos de EM sea una combinación de ambos efectos. Nuestros resultados apoyan la idea de que, en enfermedades que cursan con inflamación crónica como la EM, no siempre es posible diferenciar de manera inequívoca los efectos antiinflamatorios de los neuroprotectores (Sánchez y García-Merino, 2012).

Los compuestos utilizados en esta tesis doctoral como posibles tratamientos para la EM presentan afinidad, además de por CB2, por el receptor PPAR γ , y si bien la activación de los receptores PPAR está relacionada fundamentalmente con respuestas antiinflamatorias (Feinstein y cols., 2002), también hay estudios que demuestran efectos neuroprotectores tras el tratamiento con agonistas de PPAR γ en diferentes modelos de excitotoxicidad *in vitro* (Aoun y cols., 2003; Zhao y cols., 2006), en un modelo de lesión de la médula espinal en ratón (McTigue y cols., 2007) o de lesión cerebral por traumatismo (Yi y cols., 2008). Un ejemplo ilustrativo es el de la pioglitazona, un agonista del receptor PPAR γ que reduce el número de células microgliales activadas protegiendo así a las neuronas en modelos de esclerosis lateral amiotrófica (Schütz y cols., 2005), de adrenoleucodistrofia (Morató y cols., 2013) y de Parkinson (Dehmer y cols., 2004). El estudio de Dehmer y cols. sugiere que la pioglitazona podría activar PPAR γ , induciendo la activación de la quinasa I κ B α , e inhibiendo la activación de NF κ B. La activación del receptor PPAR γ con pioglitazona también es capaz de proteger del daño axonal y la desmielinización en el modelo de EAE (Feinstein y cols.,

2002). Todo ello apunta a que el efecto neuroprotector de VCE-003 observado podría ser debido a la activación del receptor PPAR γ , además de la activación del receptor CB2.

Sin embargo, la literatura científica indica que la protección neuronal relacionada con el tratamiento con cannabinoides está mediada principalmente por el receptor CB1 (Tomiya y Funada, 2014; Pryce y cols., 2015), y en menor medida por la activación del receptor CB2, cuyas acciones se han asociado al reclutamiento, activación y migración de células microgliales a las zonas lesionadas y a la acción de éstas sobre la homeostasis neuronal (Fernández-Ruiz y cols., 2008). Conviene señalar que existen evidencias a favor de la participación de los receptores CB1 y CB2 en la capacidad neuroprotectora de los cannabinoides frente a excitotoxicidad (Molina-Holgado y cols., 2005; Fernández-López y cols., 2006; Docagne y cols., 2007).

Si bien los derivados de fitocannabinoides estudiados en esta tesis doctoral no presentan afinidad por el receptor CB1, es necesario considerar que podrían modular el tono endógeno afectando a diversos elementos del sistema cannabinoide. Ello haría posible que los endocannabinoides activasen el receptor CB1, mejorando la sintomatología y disminuyendo la degeneración axonal observada tras el tratamiento con el compuesto VCE-003. Existen precedentes de la modulación indirecta del sistema endocannabinoide, como por ejemplo la acción de la PEA, N-oleoiletanolamida y N-linoleoiletanolamida como sustratos alternativos de la FAAH (Bisogno y cols., 1997), provocando un retardo en la degradación de AEA. El CBD también puede actuar como un inhibidor de FAAH, produciendo una acumulación de AEA (Bisogno y cols., 2001; De Petrocellis y cols., 2011). Igualmente ocurre con los monoacilglicérols de los ácidos palmítico, oleico y linoleico, que inhiben la hidrólisis enzimática del 2-AG y potencian su actividad sobre los receptores CB1 y CB2 (Ben-Shabat y cols., 1998).

En los últimos años está cobrando cada vez mayor importancia el estrés oxidativo, fundamentalmente mitocondrial, en el daño axonal en EM (Campbell y cols., 2014). Es de interés que en nuestro estudio los niveles de Nrf2, una de las principales rutas antioxidantes, resulten disminuidos en médula espinal en EAE con el tratamiento con VCE-003. En principio podría parecer una incongruencia que VCE-003 estimulase la vía de Nrf2 en cultivos celulares, como comentamos previamente, e indujese el efecto contrario en el modelo de EAE, pero existen dos posibles explicaciones. La primera tiene que ver con el momento de determinación de los niveles de Nrf2, que se efectuó al finalizar el experimento y no en el pico de la enfermedad, cuando es necesaria la puesta en marcha de mecanismos antioxidantes para mantener el balance oxidativo. Además, observando la leve sintomatología de los ratones que recibieron VCE-003 durante todo el experimento, la segunda posibilidad es que precisamente el tratamiento con VCE-003 haya frenado el estrés oxidativo y no sea necesario activar la vía de Nrf2.

Además de VCE-003, se estudió el potencial terapéutico de otros dos derivados del fitocannabinoide CBG, VCE-003.2 y VCE-006, en el modelo de EAE. VCE-003.2 es un derivado no electrofílico del CBG, cuya modificación sobre el compuesto VCE-003 hace que pierda la afinidad por el receptor CB2, y en contrapartida, aumente la afinidad por el receptor PPAR γ (Díaz-Alonso y cols., en preparación). El tratamiento con VCE-003.2 resultó efectivo en la disminución de las deficiencias neurológicas observadas en los animales que desarrollaron EAE. Se observaron diferencias intragrupo apreciables en los animales que recibieron el tratamiento, pero se redujeron al finalizar el experimento. Las variaciones en la afinidad por los receptores CB2 y PPAR γ respecto al compuesto VCE-003 no indujeron una mejora sustancial en las deficiencias neurológicas si comparamos los tratamientos de ambos compuestos, aunque tenemos que resaltar que el compuesto VCE-003.2 se administró a una dosis mayor (el doble) que VCE-003. Posiblemente la pérdida de afinidad por el receptor CB2 merme el potencial antiinflamatorio del compuesto VCE-003.2.

Respecto al tratamiento con VCE-006 (formado por dos moléculas unidas de VCE-003), el compuesto resultó efectivo significativamente los primeros días en los que los ratones presentaron deficiencias neurológicas, pero perdió la efectividad varios días antes de finalizar el experimento, aproximándose a los valores de puntuación clínica de los ratones tratados con vehículo, y siendo significativa la diferencia con el compuesto VCE-003. Independientemente de la pérdida de eficacia durante los últimos días del experimento, la puntuación clínica acumulada evidenció mejoras globales con el tratamiento con VCE-006, sin llegar al efecto terapéutico ejercido por VCE-003.

2. Eficacia terapéutica del derivado del fitocannabinoide cannabidiol, VCE-004.8

El CBD, el principal cannabinoide no psicotrópico, es uno de los fitocannabinoides más prometedores desde el punto de vista terapéutico y en ámbitos muy diferentes. Ello se debe a que puede ejercer un amplio abanico de efectos, entre los que destacan el antiinflamatorio, neuroprotector, antipsicótico y analgésico (Izzo y cols., 2009). Aun así, la farmacología del CBD es compleja, con múltiples dianas moleculares, alguna de ellas poco definidas en la actualidad (Bih y cols., 2015).

En la presente tesis doctoral se ha valorado el potencial neuroprotector del compuesto VCE-004.8, derivado del CBD y capaz de activar los receptores CB2 y PPAR γ , en cultivos de neuronas. El compuesto protegió de la muerte neuronal de manera significativa utilizando glutamato como estímulo tóxico. Además, se valoró su capacidad antiinflamatoria, determinando el efecto de VCE-004.8 sobre la liberación de PGE $_2$ en cultivos primarios de microglía tras estimularlos con LPS. El compuesto VCE-004.8 se comportó como un eficaz antiinflamatorio, disminuyendo la liberación de PGE $_2$.

Diversos estudios han descrito la acción neuroprotectora del CBD frente a un estímulo tóxico con glutamato en cultivos neuronales (Hampson y cols., 1998; Pertwee, 2004; Mechoulam y cols., 2007), y en un modelo *in vitro* de encefalopatía hipoxico-isquémica neonatal (Castillo y cols., 2010). Asimismo, son diversos los trabajos que muestran la acción antiinflamatoria del CBD, por ejemplo, disminuyendo en cultivos organotípicos de cerebro los niveles de IL-6, y la expresión de TNF α , iNOS y COX-2 en condiciones de hipoxia-isquemia (Castillo y cols., 2010), o reduciendo los niveles IL-1 β y de óxido nítrico a través de la activación del receptor CB2 en cultivos de microglía tras un incremento de calcio intracelular inducido por ATP (Martín-Moreno y cols., 2011).

Respecto al uso del CBD como tratamiento en modelos de EM, el grupo de Vogel describió una bajada en la puntuación clínica de ratones en el modelo de EAE (Kozela y cols., 2011). Dicha mejora estaba asociada a acciones neuroprotectoras y antiinflamatorias, así como a una bajada en la infiltración de linfocitos al parénquima nervioso en médula espinal. También se han observado efectos antiinflamatorios del tratamiento con CBD en el modelo de EM de etiología viral TMEV (Mecha y cols., 2013b), aunque en este caso el tratamiento fue en fase temprana de la enfermedad, cuando aún no ha aparecido la sintomatología asociada al modelo. En referencia a modelos animales de otras enfermedades, el CBD redujo la expresión de IL-1 β e iNOS en un modelo de Alzheimer (Espósito y cols., 2007), disminuyó los niveles de TNF α en un modelo de artritis (Malfait y cols., 2000), atenuó los niveles de TNF α e inhibió la recaptación de adenosina en un modelo en un modelo murino de inflamación aguda inducida por LPS (Carrier y cols., 2006; Ruiz-Valdepeñas y cols., 2011), acentuando su rol inmunomodulador. El CBD también exhibió acciones neuroprotectoras en modelos animales, por ejemplo frente a excitotoxicidad en un mo-

delo de Parkinson (Lastres-Becker y cols., 2005) o en un modelo de daño cerebral tras un proceso hipóxico-isquémico en crías de cerdo (Álvarez y cols., 2008).

En este sentido, existe un gran interés en el desarrollo de derivados de CBD con un perfil farmacológico definido, en un intento de mejorar su posible explotación terapéutica. Precisamente, el compuesto HU-308, un derivado del CBD cuya modificación del fitocannabinoide de origen hace que presente afinidad por el receptor CB2 ($K_i = 22,7 \text{ nM}$), pero no tenga afinidad por el receptor CB1 ($K_i > 10 \text{ } \mu\text{M}$), muestra un perfil antiinflamatorio y neuroprotector. Un ejemplo ilustrativo es la reducción de los niveles de las quimioquinas CCL3 y CCL4 en un modelo de isquemia hepática (Rajesh y cols., 2007). También disminuyó la liberación de citoquinas proinflamatorias en cultivos de macrófagos y mejoró la sintomatología en un modelo murino de artritis reumatoide (Gui y cols., 2015), todo ello mediado a través de la activación del receptor CB2. En enfermedades neurodegenerativas, HU-308 también se comportó como neuroprotector frente a excitotoxicidad en un modelo de Parkinson (García-Arencibia y cols., 2007).

Respecto al potencial terapéutico del compuesto de nuestro interés, VCE-004.8, hemos comparado su eficacia con el tratamiento con DMF en los dos modelos de EM. El DMF, como ya se ha comentado, es una terapia oral recientemente aprobada para EM, que se comercializa en la actualidad para reducir los brotes en los pacientes con EM-RR y que posee propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras. Aunque no se conocen en profundidad todos los mecanismos de acción del DMF, se sabe que activa la ruta antioxidante de Nrf2 y disminuye la activación de NF κ B (para más información, consultar la revisión de Deeks, 2016).

VCE-004.8 mejoró significativamente la severidad clínica en el modelo de EAE y recuperó la actividad motora horizontal y vertical de los animales a niveles control en el modelo de TMEV, asemejándose al efecto ejercido por el DMF. Sin embargo, hay que resaltar que la dosis de DMF (15 mg/kg) era mayor que la utilizada en el caso de VCE-004.8 (10 mg/kg), aunque debe considerarse que la ruta de administración de los compuestos fue diferente. Una de las observaciones más significativas que podría explicar la atenuación de los signos clínicos con el tratamiento con VCE-004.8 fue la disminución del número de infiltrados celulares y linfocitos T CD4⁺ en médula espinal en EAE y TMEV-IDD. También la mejoría debida al tratamiento con DMF se ha asociado a la reducción de la infiltración de macrófagos en parénquima de médula espinal, y a la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias en el modelo de EAE (Schilling y cols., 2006) y en el modelo de TMEV-IDD (Kobayashi y cols., 2015).

Trabajos recientes de nuestro laboratorio han mostrado cómo el compuesto Sativex[®] ejerce efectos antiinflamatorios en dos modelos de EM, principalmente por la acción del CBD sobre los

receptores CB2 y PPAR γ en el modelo de TMEV (Feliú y cols., 2015), reduciendo la reactividad microglial, disminuyendo los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentando la expresión del marcador antiinflamatorio Arg-1; y por la acción del THC en el modelo de EAE (Moreno-Martet y cols., 2015), reduciendo el número de infiltrados celulares en parénquima.

Por otra parte, el tratamiento con el compuesto VCE-004.8 disminuyó la intensidad de marcaje de neurofilamento H observada en los animales tratados con vehículo en ambos modelos, TMEV y EAE, lo que sugiere una reducción en el daño axonal. El estudio de Reick y cols. (2014) demostró una mejora en la degeneración axonal con el tratamiento con DMF en EAE, asemejándose a lo observado con VCE-004.8.

En resumen, el compuesto VCE-004.8 se perfila como un buen candidato para el desarrollo de formulaciones orales que permita comparar su eficacia con las nuevas terapias orales utilizadas en pacientes con EM.

Son numerosos los estudios que han demostrado que el receptor CB2 juega un importante papel en el control de la neuroinflamación crónica, reduciendo el daño tisular y la desmielinización en enfermedades como la EM. El desarrollo de agonistas duales de los receptores CB2 y PPAR γ puede presentar un importante avance en el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades de perfil inflamatorio. En este aspecto, los derivados de fitocannabinoides no psicoactivos utilizados en esta tesis doctoral, VCE-003 y VCE-004.8, se presentan como unos prometedores agentes antiinflamatorios y neuroprotectores para el posible tratamiento de la EM.

VI. Conclusiones

1. El tratamiento con VCE-003 tiene efectos neuroprotectores, antiinflamatorios y antioxidantes en cultivos celulares, además de reducir los niveles de la molécula de adhesión VCAM-1, a través de la activación de los receptores CB2 y PPAR γ .
2. El tratamiento en fase terapéutica con VCE-003 mejora los déficits neurológicos tanto en animales infectados con TMEV, como en animales inmunizados con MOG₃₅₋₅₅. En ambos casos, el compuesto reduce la actividad microglial, disminuye la expresión de moléculas de adhesión y el número de infiltrados linfocitarios en médula espinal. Asimismo, VCE-003 ejerce un efecto neuroprotector y disminuye la desmielinización en ambos modelos de EM.
3. La administración de los derivados VCE-003.2 o VCE-006 atenúan las deficiencias neurológicas asociadas al modelo de EAE, pero de manera menos efectiva que el compuesto VCE-003.
4. El tratamiento *in vitro* con el derivado de CBD, VCE-004.8, reduce la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad, e induce un efecto antiinflamatorio en cultivos de microglía estimulados con LPS.
5. La administración de VCE-004.8 reduce las alteraciones motoras y neurológicas asociadas a los modelos TMEV y EAE. Además, VCE-004.8 reduce la actividad microglial y el número de infiltrados linfocitarios en médula espinal, además de disminuir el daño axonal y la desmielinización en los animales tratados.

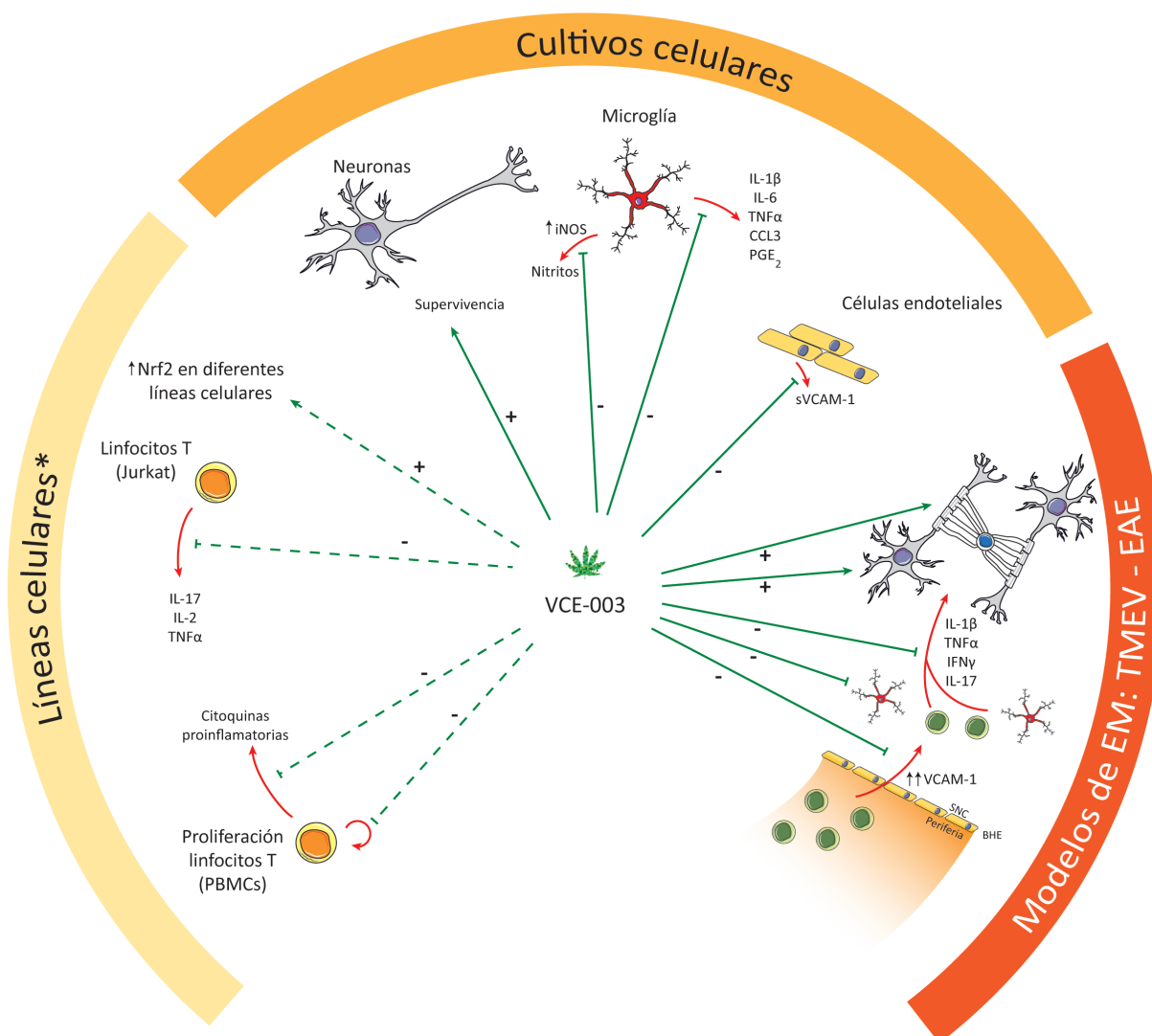


Figura 44. Esquema de las acciones ejercidas por el compuesto VCE-003. *Experimentos realizados en colaboración con el grupo de Inmunología de la Universidad de Córdoba (Carrillo-Salinas y cols., 2014).

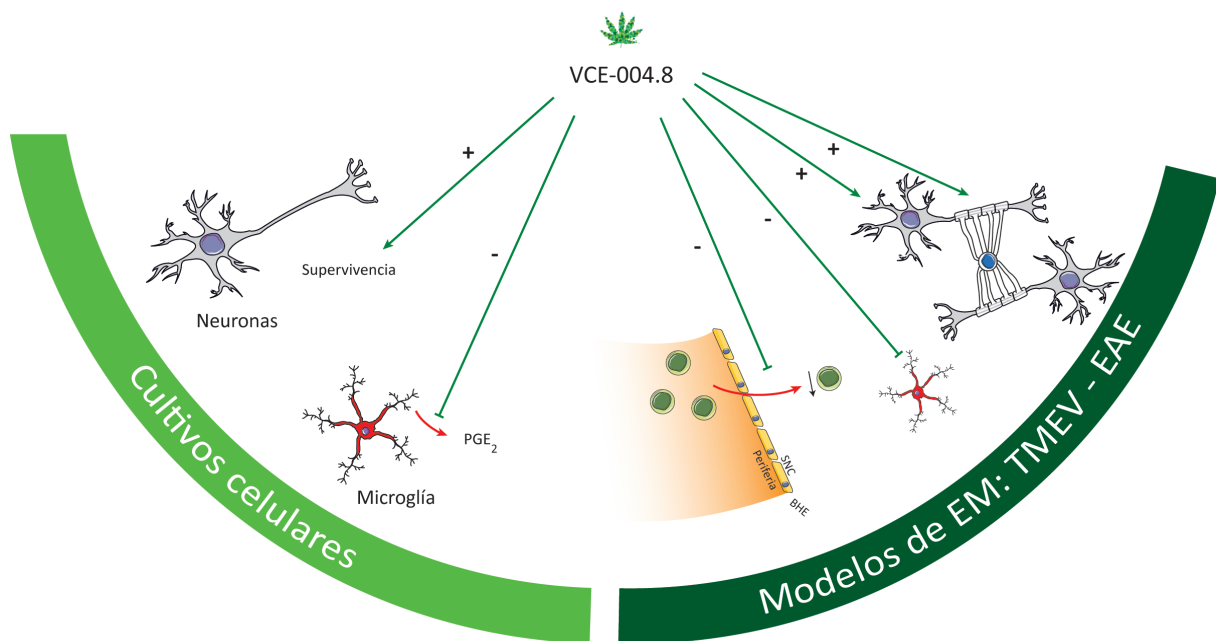


Figura 45. Esquema de las acciones ejercidas por el compuesto VCE-004.8.

VII. Referencias

Achiron A, Miron S, Lavie V, Margalit R, Biegon A (2000). Dexanabinol (HU-211) effect on experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 102(1):26-31.

Adams R, Baker BR, Wearn RB (1940). Structure of cannabinol III. Synthesis of cannabinol, 11-hydroxy-3-n-amyl-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran. *J Am Chem Soc*; 62:2204-2207.

Agüado T, Carracedo A, Julien B, Velasco G, Milman G, Mechoulam R, Alvarez L, Guzmán M, Galve-Roperh I (2007). Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem*; 282(9):6854-62.

Alloisi F, Serafini B, Adorini L (2000). Glia-T cell dialogue. *J Neuroimmunol*; 107(2):111-7.

Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M, Pertwee RG, Castillo AI, Romero J, Martínez-Orgado J (2008). Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res*; 64(6):653-8.

Alvarez JI, Cayrol R, Prat A (2011). Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*; 1812(2):252-64.

Aoun P, Watson DG, Simpkins JW (2003). Neuroprotective effects of PPARgamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells. *Eur J Pharmacol*; 472(1-2):65-71.

Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod*; 71(8):1427-30.

Arévalo-Martín A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C (2003). Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci*; 23(7):2511-6.

Ascherio A, Munger KL (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*; 61(4):288-99.

Ashton JC, Glass M (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*; 5(2):73-80.

Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L (2000). Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*; 404(6773):84-7.

Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V (2001). Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J*; 15(2):300-2.

Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*; 27(1):1-4.

Baldwin AS Jr (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*;14:649-83.

Ball S, Vickery J, Hobart J, Wright D, Green C, Shearer J, Nunn A, Cano MG, MacManus D, Miller D, Mallik S, Zajicek J (2015). The Cannabinoid Use in Progressive Inflammatory brain Disease (CUPID) trial: a randomised double-blind placebo-controlled parallel-group multicentre trial and economic evaluation of cannabinoids to slow progression in multiple sclerosis. *Health Technol Assess*; 19(12):vii-viii, xxv-xxxi, 1-187.

Barreiro O, Sánchez-Madrid F (2009). Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Rev Esp Cardiol*; 62(5):552-62.

Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F (2007). Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev*; 218:147-64.

Barrett ML, Gordon D, Evans FJ (1985). Isolation from *Cannabis sativa* L. of cannflavin--a novel inhibitor of prostaglandin production. *Biochem Pharmacol*; 34(11):2019-24.

Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD (1995). The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*; 15(4):437-46.

Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, Romero J (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*; 23(35):11136-41.

Benito C, Romero JP, Tolón RM, Clemente D, Docagne F, Hillard CJ, Guaza C, Romero J (2007). Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci*; 27(9):2396-402.

Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J (2008). Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol*; 153(2):277-85.

Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R (1998). An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*; 353(1):23-31.

Bermudez-Silva FJ, Sanchez-Vera I, Suárez J, Serrano A, Fuentes E, Juan-Pico P, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F (2007). Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *Eur J Pharmacol*; 565(1-3):207-11.

Bih CI, Chen T, Nunn AV, Bazet M, Dallas M, Whalley BJ (2015). Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*; 12(4):699-730.

Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V (1997). Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem*; 272(6):3315-23.

Bisogno T, Delton-Vandenbroucke I, Milone A, Lagarde M, Di Marzo V (1999). Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Arch Biochem Biophys*; 370(2):300-7.

Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*; 134(4):845-52.

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*; 163(3):463-8.

Bö L, Peterson JW, Mørk S, Hoffman PA, Gallatin WM, Ransohoff RM, Trapp BD (1996). Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*; 55(10):1060-72.

Borrelli F, Fasolino I, Romano B, Capasso R, Maiello F, Coppola D, Orlando P, Battista G, Pagnano E, Di Marzo V, Izzo AA (2013). Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*; 85(9):1306-16.

Bouaboula M, Hilairiet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P (2005). Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*; 517(3):174-81.

Brown AJ (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*; 152(5):567-75.

Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol*; 396(2-3):141-9.

Cabral GA, Marciano-Cabral F (2005). Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol*; 78(6):1192-7.

Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sánchez A, Mestre L, Valenti M, García-Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J (2005). Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*; 20(2):207-17.

Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Foresti R, Bates TE, Giuffrida Stella AM, Pen-nisi G (2002). Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *J Neurosci Res*; 70(4):580-7.

Campbell GR, Worrall JT, Mahad DJ (2014). The central role of mitochondria in axonal dege-neration in multiple sclerosis. *Mult Scler*; 20(14):1806-13.

Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ (2006). Inhibition of an equilibrative nucleoside trans-porter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103(20):7895-900.

Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA Jr (2000). Differential adhesion molecule requi-rements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain*; 123 (Pt 6):1092-101.

Cascio MG, Gauson LA, Stevenson LA, Ross RA, Pertwee RG (2010). Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha2-adrenoceptor agonist and moderately po-tent 5HT1A receptor antagonist. *Br J Pharmacol*; 159(1):129-41.

Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J (2010). The neuropro-TECTIVE effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis*; 37(2):434-40.

Centonze D, Bari M, Rossi S, Prosperetti C, Furlan R, Fezza F, De Chiara V, Battistini L, Ber-nardi G, Bernardini S, Martino G, Maccarrone M (2007). The endocannabinoid system is dys-regulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*; 130(Pt 10):2543-53.

Charcot M (1868). Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz Hosp*; 141:554-558.

Chaudhary P, Marracci GH, Bourdette DN (2006). Lipoic acid inhibits expression of ICAM-1 and VCAM-1 by CNS endothelial cells and T cell migration into the spinal cord in experimen-tal autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*; 175(1-2):87-96.

Chen W, Xu C, Liu HY, Long L, Zhang W, Zheng ZB, Xie YD, Wang LL, Li S (2011). Novel selective cannabinoid CB(1) receptor antagonist MJ08 with potent in vivo bioactivity and in-verse agonistic effects. *Acta Pharmacol Sin*; 32(9):1148-58.

Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J (2012). Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem*; 287(41):34660-82.

Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L; TRANSFORMS Study Group (2010). Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*; 362(5):402-15.

Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Fisher E, Brinar VV, Giovannoni G, Stojanovic M, Ertik BI, Lake SL, Margolin DH, Panzara MA, Compston DA; CARE-MS I investigators (2012). Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*; 380(9856):1819-28.

Coles A (2015). Newer therapies for multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol*; 18(Suppl 1):S30-4.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*; 9(10):899-909.

Collins T, Cybulsky MI (2001). NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*; 107(3):255-64.

Compston A (1994). The epidemiology of multiple sclerosis: principles, achievements, and recommendations. *Ann Neurol*; 36 Suppl 2:S211-7.

Connolly ES Jr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ (1996). Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest*; 97(1):209-16.

Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, Wysocka M, Hilliard B, Fujioka T, Murphy S, Tighe PJ, Das Sarma J, Trinchieri G, Rostami A (2005). Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J Neurochem*; 95(2):331-40.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*; 384(6604):83-7.

Croxford JL, Miller SD (2003). Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212. *J Clin Invest*; 111(8):1231-40.

Croxford JL, Pryce G, Jackson SJ, Ledent C, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Baker CD (2008). Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 193(1-2):120-9.

Dal Canto MC, Lipton HL (1975). Primary demyelination in Theiler's virus infection. An ultrastructural study. *Lab Invest*; 33(6):626-37.

Dal Canto MC, Lipton HL (1977). A new model of persistent viral infection with primary demyelination. *Neurol Neurocir Psiquiatr*; 18(2-3 Suppl):455-67.

Daniels JB, Pappenheimer AM, Richardson S (1952). Observations on encephalomyelitis of mice (DA strain). *J Exp Med*; 96(6):517-30.

De Bock M, Culot M, Wang N, da Costa A, Decrock E, Bol M, Bultynck G, Cecchelli R, Leybaert L (2012). Low extracellular Ca²⁺ conditions induce an increase in brain endothelial permeability that involves intercellular Ca²⁺ waves. *Brain Res*; 1487:78-87.

Deeks ED (2016). Dimethyl Fumarate: A Review in Relapsing-Remitting MS. *Drugs*; 76(2):243-54.

Dehmer T, Heneka MT, Sastre M, Dichgans J, Schulz JB (2004). Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. *J Neurochem*; 88(2):494-501.

De Lago E, de Miguel R, Lastres-Becker I, Ramos JA, Fernández-Ruiz J (2004). Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence. *Brain Res*; 1007(1-2):152-9.

De Lago E, Moreno-Martet M, Cabranes A, Ramos JA, Fernández-Ruiz J (2012). Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology*; 62(7):2299-308.

De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini PC, Orlando P, Di Marzo V (2008). Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther*; 325(3):1007-15.

De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*; 163(7):1479-94.

De Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, 't Hart BA, Laman JD (2002). Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol*; 169(10):5415-23.

Del Río C, Navarrete C, Collado JA, Bellido ML, Gómez-Cañas M, Pazos MR, Fernández-Ruiz J, Pollastro F, Appendino G, Calzado MA, Cantarero I, Muñoz E (2016). The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CB2 pathways. *Sci Rep*; 6:21703.

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*; 34(5):605-13.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*; 258(5090):1946-9.

Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, Katz R, Di Marzo V, Jutras-Aswad D, Notcutt WG, Martinez-Orgado J, Robson PJ, Rohrback BG, Thiele E, Whalley B, Friedman D (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*; 55(6):791-802.

Diab A, Deng C, Smith JD, Hussain RZ, Phanavanh B, Lovett-Racke AE, Drew PD, Racke MK (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*; 168(5):2508-15.

Díaz-Alonso J, Paraíso-Luna J, Navarrete C, Del Río C, Cantarero I, Palomares B, Fernández-Ruiz J, Bellido ML, Appendino G, Galve-Roperh I, Muñoz E (en preparación). VCE-003.2 a novel cannabigerol derivative enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington disease.

Díaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L (2005). Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem*; 5(7):619-30.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*; 372(6507):686-91.

Di Marzo V, Fontana A (1995). Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 53(1):1-11.

Di Marzo V, Lastres-Becker I, Bisogno T, De Petrocellis L, Milone A, Davis JB, Fernandez-Ruiz J (2001). Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *Eur J Pharmacol*; 420(2-3):123-31.

Di Marzo V, Piscitelli F (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*; 12(4):692-8.

Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*; 121(1-2):149-58.

Dobson R, Rudick RA, Turner B, Schmierer K, Giovannoni G (2014). Assessing treatment response to interferon- β : is there a role for MRI? *Neurology*; 82(3):248-54.

Docagne F, Muñetón V, Clemente D, Ali C, Loría F, Correa F, Hernangómez M, Mestre L, Vivien D, Guaza C (2007). Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Mol Cell Neurosci*; 34(4):551-61.

Domínguez-Mozo MI, García-Montojo M, Arias-Leal A, García-Martínez Á, Santiago JL, Casanova I, Galán V, Arroyo R, Fernández-Arquero M, Alvarez-Lafuente R (2016). Monitoring the John Cunningham virus throughout natalizumab treatment in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*; 23(1):182-9.

Drescher KM, Rivera-Quinones C, Lucchinetti CF, Rodriguez M (1998). Failure of treatment with Linomide or oral myelin tolerization to ameliorate demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 88(1-2):111-9.

Dutta R, Trapp BD (2011). Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*; 93(1):1-12.

Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation*; 2:29.

Eikelenboom MJ, Killestein J, Izeboud T, Kalkers NF, Baars PA, van Lier RA, Barkhof F, Uitdehaag BM, Polman CH (2005). Expression of adhesion molecules on peripheral lymphocytes predicts future lesion development in MS. *J Neuroimmunol*; 158(1-2):222-30.

Eisenstein TK, Meissler JJ (2015). Effects of Cannabinoids on T-cell Function and Resistance to Infection. *J Neuroimmune Pharmacol*; 10(2):204-16.

Engelhardt B, Coisne C (2011). Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS*; 8(1):4.

Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L Jr, De Filippis D, Cottone P, Iuvone T, Cuomo V, Steardo L (2007). Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *Br J Pharmacol*; 151(8):1272-9.

Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N (2009). Integrins in immunity. *J Cell Sci*; 122(Pt 2):215-25.

Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J (2015). Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 86(1):26-31.

Farooque M, Isaksson J, Olsson Y (1999). Improved recovery after spinal cord trauma in ICAM-1 and P-selectin knockout mice. *Neuroreport*; 10(1):131-4.

Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR (2000). Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci*; 15(6):510-21.

Feigenbaum JJ, Bergmann F, Richmond SA, Mechoulam R, Nadler V, Kloog Y, Sokolovsky M (1989). Nonpsychotropic cannabinoid acts as a functional N-methyl-D-aspartate receptor blocker. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 86(23):9584-7.

Feinstein DL, Galea E, Gavrilyuk V, Brosnan CF, Whitacre CC, Dumitrescu-Ozimek L, Landreth GE, Pershadsingh HA, Weinberg G, Heneka MT (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*; 51(6):694-702.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, Koppel GA, Brownstein M (1998). LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmask coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther*; 284(1):291-7.

Felder CC, Glass M (1998). Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 38:179-200.

Feliú A, Moreno-Martet M, Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, de Lago E, Fernández-Ruiz J, Guaza C (2015). A Sativex®-like combination of phytocannabinoids as a disease-modifying therapy in a viral model of multiple sclerosis. *Br J Pharmacol*; 172(14):3579-95.

Fernández O, Fernández VE (1998). Esclerosis múltiple. Fundación Española de Esclerosis Múltiple.

Fernández O, Rodríguez-Antigüedad A (2010). Epidemiología de la esclerosis múltiple. En: Esclerosis Múltiple. Villoslada P (Ed). Marge Books.

Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Nuñez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2006). Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res*; 60(2):169-73.

Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M (2007). Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci*; 28(1):39-45.

Fernández-Ruiz J, Pazos MR, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos JA (2008). Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol*; 286(1-2 Suppl 1):S91-6.

Filippini G, Munari L, Incorvaia B, Ebers GC, Polman C, D'Amico R, Rice GP (2003). Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet*; 361(9357):545-52.

Fox A, Bevan S (2005). Therapeutic potential of cannabinoid receptor agonists as analgesic agents. *Expert Opin Investig Drugs*; 14(6):695-703.

Franklin RJ, Ffrench-Constant C (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci*; 9(11):839-55.

Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*; 83(3):1017-66.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*; 354(9):942-55.

Fujinami RS, Oldstone MB (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science*; 230(4729):1043-5.

Fujita K, Yamafuji M, Nakabeppu Y, Noda M (2012). Therapeutic approach to neurodegenerative diseases by medical gases: focusing on redox signaling and related antioxidant enzymes. *Oxid Med Cell Longev*; 2012:324256.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*; 232(1):54-61.

Gallily R, Breuer A, Mechoulam R (2000). 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. *Eur J Pharmacol*; 406(1):R5-7.

Gaoni Y, Mechoulam R (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*; 86 (8), pp 1646–1647.

García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res*; 1134(1):162-70.

García-Montojo M, de la Hera B, Varadé J, de la Encarnación A, Camacho I, Domínguez-Mozo M, Árias-Leal A, García-Martínez A, Casanova I, Izquierdo G, Lucas M, Fedetz M,

Alcina A, Arroyo R, Matesanz F, Urcelay E, Alvarez-Lafuente R (2014). HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSRV. *Retrovirology*; 11:2.

Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A (1996). 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*; 307(3):331-8.

George KL, Saltman LH, Stein GS, Lian JB, Zurier RB (2008). Ajulemic acid, a nonpsychoactive cannabinoid acid, suppresses osteoclastogenesis in mononuclear precursor cells and induces apoptosis in mature osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*; 214(3):714-20.

Ghosh S, Hayden MS (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*; 8(11):837-48.

Giacoppo S, Galuppo M, Pollastro F, Grassi G, Bramanti P, Mazzon E (2015). A new formulation of cannabidiol in cream shows therapeutic effects in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Daru*; 23(1):48.

Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev*; 54(2):271-84.

Giovannoni G, Heales SJ, Land JM, Thompson EJ (1998). The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Mult Scler*; 4(3):212-6.

Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci*; 2(4):358-63.

Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG (2005). Anandamide transport: a critical review. *Life Sci*; 77(14):1584-604.

Gold R, Linington C, Lassmann H (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*; 129(Pt 8):1953-71.

Gold R, Wolinsky JS (2011). Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand*; 124(2):75-84.

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*; 132(1):87-92.

Gomez O, Arevalo-Martin A, Garcia-Ovejero D, Ortega-Gutierrez S, Cisneros JA, Almazan G, Sánchez-Rodríguez MA, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E (2010). The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation. *Glia*; 58(16):1913-27.

Gomez O, Sanchez-Rodriguez A, Le M, Sanchez-Caro C, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E (2011). Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways. *Br J Pharmacol*; 163(7):1520-32.

Gomez O, Sanchez-Rodriguez MA, Ortega-Gutierrez S, Vazquez-Villa H, Guaza C, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E (2015). A Basal Tone of 2-Arachidonoylglycerol Contributes to Early Oligodendrocyte Progenitor Proliferation by Activating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT and the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Pathways. *J Neuroimmune Pharmacol*; 10(2):309-17.

Gomez-Nicola D, Spagnolo A, Guaza C, Nieto-Sampedro M (2010). Aggravated experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-15 knockout mice. *Exp Neurol*; 222(2):235-42.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*; 1071(1):10-23.

Granja AG, Carrillo-Salinas F, Pagani A, Gómez-Cañas M, Negri R, Navarrete C, Mecha M, Mestre L, Fiebich BL, Cantarero I, Calzado MA, Bellido ML, Fernandez-Ruiz J, Appendino G, Guaza C, Muñoz E (2012). A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*; 7(4):1002-16.

Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B (2011). Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 37(1):24-39.

Groom AJ, Smith T, Turski L (2003). Multiple sclerosis and glutamate. *Ann N Y Acad Sci*; 993:229-75; discussion 287-8.

Grotenhermen F, Müller-Vahl K (2012). The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Dtsch Arztebl Int*; 109(29-30):495-501.

Gundy RI, Rabuffetti M, Beltramo M (2001). Cannabinoids and neuroprotection. *Mol Neurobiol*; 24(1-3):29-51.

Gui H, Liu X, Liu LR, Su DF, Dai SM (2015). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates synovitis and joint destruction in collagen-induced arthritis. *Immunobiology*; 220(6):817-22.

Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*; 20(2):441-58.

Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bempohl D, Jin H, Wang X, Rosenberg GA, Lo EH, Moskowitz MA (2004). Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest*; 113(10):1447-55.

Gwag BJ, Canzoniero LM, Sensi SL, Demaro JA, Koh JY, Goldberg MP, Jacquin M, Choi DW (1999). Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience*; 90(4):1339-48.

Haarmann A, Nowak E, Deiß A, van der Pol S, Monoranu CM, Kooij G, Müller N, van der Valk P, Stoll G, de Vries HE, Berberich-Siebelt F, Buttmann M (2015). Soluble VCAM-1 impairs human brain endothelial barrier integrity via integrin α -4-transduced outside-in signalling. *Acta Neuropathol*; 129(5):639-52.

Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*; 59(5):1609-23.

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998). Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(14):8268-73.

Hanus LO (2009). Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med Res Rev*; 29(2):213-71.

Hao J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y (2007). Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem*; 101(2):566-76.

Hasseldam H, Johansen FF (2010). Neuroprotection without immunomodulation is not sufficient to reduce first relapse severity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*; 17(4):252-64.

Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*; 19(6):578-87.

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH; HERMES Trial Group (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*; 358(7):676-88.

Hernández-Pedro NY, Espinosa-Ramirez G, de la Cruz VP, Pineda B, Sotelo J (2013). Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clin Dev Immunol*; 2013:413465.

Hernández-Torres G, Cipriano M, Hedén E, Björklund E, Canales Á, Zian D, Feliú A, Mecha M, Guaza C, Fowler CJ, Ortega-Gutiérrez S, López-Rodríguez ML (2014). A reversible and selective inhibitor of monoacylglycerol lipase ameliorates multiple sclerosis. *Angew Chem Int Ed Engl*; 53(50):13765-70.

Hertz F, Deghenghi R (1985). Effect of rat and beta-human interferons on hyperacute experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Agents Actions*; 16(5):397-403.

Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*; 28(2):254-60.

Hickey WF (1999). Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol*; 11(2):125-37.

Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol Ther*; 133(1):79-97.

Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther*; 289(3):1427-33.

Hollenbach JA, Oksenberg JR (2015). The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*; 64:13-25.

Horváth B, Magid L, Mukhopadhyay P, Bátkaí S, Rajesh M, Park O, Tanchian G, Gao RY, Goodfellow CE, Glass M, Mechoulam R, Pacher P (2012). A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Br J Pharmacol*; 165(8):2462-78.

Housley WJ, Pitt D, Hafler DA (2015). Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol*; 161(1):51-8.

Howlett AC, Fleming RM (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*; 26(3):532-8.

Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*; 29(3):307-13.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*; 54(2):161-202.

Inoue A, Koh CS, Yamazaki M, Ichikawa M, Isobe M, Ishihara Y, Yagita H, Kim BS (1997). Anti-adhesion molecule therapy in Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating

disease. *Int Immunol*; 9(12):1837-47.

Iseger TA, Bossong MG (2015). A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophr Res*; 162(1-3):153-61.

Iskedjian M, Bereza B, Gordon A, Piwko C, Einarson TR (2007). Meta-analysis of cannabis based treatments for neuropathic and multiple sclerosis-related pain. *Curr Med Res Opin*; 23(1):17-24.

Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R (2009). Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*; 30(10):515-27.

James E, Dobson R, Kuhle J, Baker D, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2013). The effect of vitamin D-related interventions on multiple sclerosis relapses: a meta-analysis. *Mult Scler*; 19(12):1571-9.

Jackson SJ, Pryce G, Diemel LT, Cuzner ML, Baker D (2005). Cannabinoid-receptor 1 null mice are susceptible to neurofilament damage and caspase 3 activation. *Neuroscience*; 134(1):261-8.

Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lottersztajn S (2005). Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*; 128(3):742-55.

Kaminski NE, Abood ME, Kessler FK, Martin BR, Schatz AR (1992). Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Mol Pharmacol*; 42(5):736-42.

Kaplan BL (2013). The role of CB1 in immune modulation by cannabinoids. *Pharmacol Ther*; 137(3):365-74.

Kappel CA, Melvold RW, Kim BS (1990). Influence of sex on susceptibility in the Theiler's murine encephalomyelitis virus model for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 29(1-3):15-9.

Karst M, Salim K, Burstein S, Conrad I, Hoy L, Schneider U (2003). Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *JAMA*; 290(13):1757-62.

Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH (2003). Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci*; 23(25):8733-42.

Kim BS, Palma JP, Kwon D, Fuller AC (2005). Innate immune response induced by Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *Immunol Res*; 31(1):1-12.

Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA (2013). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol*; 13:128.

Kobayashi K, Tomiki H, Inaba Y, Ichikawa M, Kim BS, Koh CS (2015). Dimethyl fumarate suppresses Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease by modifying the Nrf2-Keap1 pathway. *Int Immunol*; 27(7):333-44.

Klotz L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Hucke S, Alferink J, Nowak N, Beyer M, Mayer G, Langhans B, Klockgether T, Waisman A, Eberl G, Schultze J, Famulok M, Kolanus W, Glass C, Kurts C, Knolle PA (2009). The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med*; 206(10):2079-89.

Kokona D, Thermos K (2015). Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity in vivo, via activation of CB1 receptors: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Exp Eye Res*; 136:45-58.

Koralnik IJ (2006). Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited: Has the disease outgrown its name? *Ann Neurol*; 60(2):162-73.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*; 4(4):471-9.

Kostic M, Zivkovic N, Stojanovic I (2013). Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. *Rev Neurosci*; 24(1):71-88.

Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ (2002). 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem*; 277(26):23278-86.

Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, Ben-Nun A, Juknat A, Vogel Z (2011). Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol*; 163(7):1507-19.

Kurtzke JF (1980). Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand*; 62(2):65-80.

Kurtzke JF (1993). Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*; 6(4):382-427.

Lin R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, Makriyannis A (1999). Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci*; 1(2):E4.

Langford RM, Mares J, Novotna A, Vachova M, Novakova I, Notcutt W, Ratcliffe S (2013). A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *J Neurol*; 260(4):984-97.

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: Implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*; 7(3):115-21.

Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2005). Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*; 19(1-2):96-107.

Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105(7):2699-704.

Lee M, Yang KH, Kaminski NE (1995). Effects of putative cannabinoid receptor ligands, anandamide and 2-arachidonyl-glycerol, on immune function in B6C3F1 mouse splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther*; 275(2):529-36.

Lemire JM, Archer DC (1991). 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*; 87(3):1103-7.

Lewerenz J, Maher P (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci*; 9:469.

Li K, Feng JY, Li YY, Yuece B, Lin XH, Yu LY, Li YN, Feng YJ, Storr M (2013). Anti-inflammatory role of cannabidiol and O-1602 in cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas*; 42(1):123-9.

Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, Moore CS, Michel L, Althekair F, Rajasekharan S, Gommerman JL, Prat A, Fillatreau S, Bar-Or A; Canadian B cells in MS Team (2015). Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med*; 7(310):310ra166.

Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*; 318(3):1375-87.

Lim ST, Miller NL, Chen XL, Tancioni I, Walsh CT, Lawson C, Uryu S, Weis SM, Cheresch DA, Schlaepfer DD (2012). Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. *J Cell Biol*; 197(7):907-19.

Lipton HL (1975). Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infect Immun*; 11(5):1147-55.

Liu J, Li H, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD (2003). Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol Pharmacol*; 63(5):983-92.

Liu B, Song S, Jones PM, Persaud SJ (2015). GPR55: from orphan to metabolic regulator? *Pharmacol Ther*; 145:35-42.

Lledó A, Borrell J, Guaza C (1999). Dexamethasone regulation of interleukin-1-receptors in the hippocampus of Theiler's virus-infected mice: effects on virus-mediated demyelination. *Eur J Pharmacol*; 372(1):75-83.

Lombard C, Nagarkatti M, Nagarkatti P (2007). CB2 cannabinoid receptor agonist, JWH-015, triggers apoptosis in immune cells: potential role for CB2-selective ligands as immunosuppressive agents. *Clin Immunol*; 122(3):259-70.

Loría F, Petrosino S, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, Hernangómez M, Guaza C, Di Marzo V, Docagne F (2008). Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide. *Eur J Neurosci*; 28(4):633-41.

Loría F, Petrosino S, Hernangómez M, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, Di Marzo V, Docagne F, Guaza C (2010). An endocannabinoid tone limits excitotoxicity in vitro and in a model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*; 37(1):166-76.

Losy J (2013). Is MS an inflammatory or primary degenerative disease? *J Neural Transm*; 120(10):1459-62.

Lou ZY, Chen C, He Q, Zhao CB, Xiao BG (2011). Targeting CB(2) receptor as a neuroinflammatory modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol*; 49(3):453-61.

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*; 523(7560):337-41.

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol*; 67(1):15-9.

Lublin FD, Lavasa M, Viti C, Knobler RL (1987). Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol*; 45(1):122-8.

Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor BV, Kilpatrick TJ, Dwyer T, Coulthard A, Chapman C, van der Mei I, Williams D, McMichael AJ (2011). Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology*; 76(6):540-8.

Lyman WD, Sonett JR, Brosnan CF, Elkin R, Bornstein MB (1989). Delta 9-tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*; 23(1):73-81.

Ma L, Jia J, Liu X, Bai F, Wang Q, Xiong L (2015). Activation of murine microglial N9 cells is attenuated through cannabinoid receptor CB2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*; 458(1):92-7.

Mackie K (2006). Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes*; 30 Suppl 1:S19-23.

Mackie K, Hille B (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89(9):3825-9.

Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreaskos E, Mechoulam R, Feldmann M (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(17):9561-6.

Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem*; 95(2):437-45.

Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D, Dittel BN (2007). Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med*; 13(4):492-7.

Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C (2002). Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem*; 80(3):448-56.

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*; 302(5642):84-8.

Martín-Moreno AM, Reigada D, Ramírez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML (2011). Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol*; 79(6):964-73.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*; 346(6284):561-4.

Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M (1992). Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. *J Neuroimmunol*; 37(1-2):23-33.

Mattace Raso G, Russo R, Calignano A, Meli R (2014). Palmitoylethanolamide in CNS health and disease. *Pharmacol Res*; 86:32-41.

McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY (2007). Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*; 6(11):2921-7.

McCarthy KD, de Vellis J (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*; 85(3):890-902.

McFarland MJ, Barker EL (2004). Anandamide transport. *Pharmacol Ther*; 104(2):117-35.

McGavern DB, Zoecklein L, Drescher KM, Rodriguez M (1999). Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination. *Exp Neurol*; 158(1):171-81.

McFarland HF, Martin R (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*; 8(9):913-9.

McKinney MK, Cravatt BF (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem*; 74:411-32.

McTigue DM, Tripathi R, Wei P, Lash AT (2007). The PPAR gamma agonist Pioglitazone improves anatomical and locomotor recovery after rodent spinal cord injury. *Exp Neurol*; 205(2):396-406.

Mecha M, Iñigo PM, Mestre L, Hernangómez M, Borrell J, Guaza C (2011). An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Nature protocols*; doi:10.1038/protex.2011.218.

Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Mestre L, Feliú A, Guaza C (2013a). Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. *Prog Neurobiol*; 101-102:46-64.

Mecha M, Feliú A, Iñigo PM, Mestre L, Carrillo-Salinas FJ, Guaza C (2013b). Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model

of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. *Neurobiol Dis*; 59:141-50.

Mecha M, Feliú A, Carrillo-Salinas FJ, Rueda-Zubiaurre A, Ortega-Gutiérrez S, de Sola RG, Guaza C (2015). Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. *Brain Behav Immun*; 49:233-45.

Mechoulam R, Shvo Y (1963). Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*; 19(12):2073-8.

Mechoulam R, Shani A, Edery H, Grunfeld Y (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science*; 169(3945):611-2.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*; 50(1):83-90.

Mechoulam R, Hanus L (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*; 108(1-2):1-13.

Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO (2007). Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*; 4(8):1678-92.

Mestre L, Correa F, Arévalo-Martín A, Molina-Holgado E, Valenti M, Ortas G, Di Marzo V, Guaza C (2005). Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. *J Neurochem*; 92(6):1327-39.

Mestre L, Docagne F, Correa F, Loría F, Hernangómez M, Borrell J, Guaza C (2009). A cannabinoid agonist interferes with the progression of a chronic model of multiple sclerosis by downregulating adhesion molecules. *Mol Cell Neurosci*; 40(2):258-66.

Mestre L, Iñigo PM, Mecha M, Correa FG, Hernangómez-Herrero M, Loría F, Docagne F, Borrell J, Guaza C (2011). Anandamide inhibits Theiler's virus induced VCAM-1 in brain endothelial cells and reduces leukocyte transmigration in a model of blood brain barrier by activation of CB(1) receptors. *J Neuroinflammation*; 8:102.

Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(7):3655-60.

Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miskiel KA, O'Connor PW; International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J*

Med; 348(1):15-23.

Miller SD, Karpus WJ (1994). The immunopathogenesis and regulation of T-cell-mediated demyelinating diseases. *Immunol Today*; 15(8):356-61.

Mnich SJ, Hiebsch RR, Huff RM, Muthian S (2010). Anti-inflammatory properties of CB1-receptor antagonist involves beta2 adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther*; 333(2):445-53.

Molina-Holgado F, Lledó A, Guaza C (1997). Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport*; 8(8):1929-33.

Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci*; 22(22):9742-53.

Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ (2003). Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci*; 23(16):6470-4.

Molina-Holgado F, Pinteaux E, Heenan L, Moore JD, Rothwell NJ, Gibson RM (2005). Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol Cell Neurosci*; 28(1):189-94.

Morató L, Galino J, Ruiz M, Calingasan NY, Starkov AA, Dumont M, Naudí A, Martínez JJ, Aubourg P, Portero-Otín M, Pamplona R, Galea E, Beal MF, Ferrer I, Fourcade S, Pujol A (2013). Pioglitazone halts axonal degeneration in a mouse model of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain*; 136(Pt 8):2432-43.

Moreno B, Espejo C, Mestre L, Suardiaz M, Clemente D, de Castro F, Fernández-Fernández MÓ, Montalban X, Villoslada P, Guaza C (2012). Guía de uso adecuado de modelos animales para el desarrollo de terapias en esclerosis múltiple. *Rev Neurol*; 54(2):114-24.

Moreno-Martet M, Feliú A, Espejo-Porras F, Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Fernández-Ruiz J, Guaza C, de Lago E (2015). The disease-modifying effects of a Sativex-like combination of phytocannabinoids in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis are preferentially due to $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol acting through CB1 receptors. *Mult Scler Relat Disord*; 4(6):505-11.

Muldoon LL, Alvarez JI, Begley DJ, Boado RJ, Del Zoppo GJ, Doolittle ND, Engelhardt B, Hallenbeck JM, Lonser RR, Ohlfest JR, Prat A, Scarpa M, Smeyne RJ, Drewes LR, Neuwelt EA (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*; 33(1):13-21.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*; 365(6441):61-5.

Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL, Nagarkatti M (2009). Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem*; 1(7):1333-49.

Navarro G, Carriba P, Gandía J, Ciruela F, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal*; 8:1088-97.

Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (2007). Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence. *J Biol Chem*; 282(21):15894-902.

Nelson AL, Bieber AJ, Rodriguez M (2004). Contrasting murine models of MS. *Int MS J*; 11(3):95-9.

Ni X, Geller EB, Eppihimer MJ, Eisenstein TK, Adler MW, Tuma RF (2004). WIN 55212-2, a cannabinoid receptor agonist, attenuates leukocyte/endothelial interactions in an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Mult Scler*; 10(2):158-64.

Noseworthy JH (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature*; 399(6738 Suppl):A40-7.

Novotna A, Mares J, Ratcliffe S, Novakova I, Vachova M, Zapletalova O, Gasperini C, Pozzilli C, Cefaro L, Comi G, Rossi P, Ambler Z, Stelmasiak Z, Erdmann A, Montalban X, Klimek A, Davies P; Sativex Spasticity Study Group (2011). A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex®), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol*; 18(9):1122-31.

Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*; 53(4):208-13.

Núñez E, Benito C, Tolón RM, Hillard CJ, Griffin WS, Romero J (2008). Glial expression of cannabinoid CB(2) receptors and fatty acid amide hydrolase are beta amyloid-linked events in Down's syndrome. *Neuroscience*; 151(1):104-10.

Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A, Bab I (2006). Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103(3):696-701.

Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N (2007). Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*; 4(8):1842-57.

Oleszak EL, Chang JR, Friedman H, Katsetos CD, Platsoucas CD (2004). Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clin Microbiol Rev*; 17(1):174-207.

Oliviero A, Arevalo-Martin A, Rotondi M, García-Ovejero D, Mordillo-Mateos L, Lozano-Sicilia A, Panyavin I, Chiovato L, Aguilar J, Foffani G, Di Lazzaro V, Molina-Holgado E (2012). CB1 receptor antagonism/inverse agonism increases motor system excitability in humans. *Eur Neuropsychopharmacol*; 22(1):27-35.

Ontaneda D, Hyland M, Cohen JA (2012). Multiple sclerosis: new insights in pathogenesis and novel therapeutics. *Annu Rev Med*; 63:389-404.

Ortega-Gutiérrez S, Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Correa F, Viso A, López-Rodríguez ML, Di Marzo V, Guaza C (2005). Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. *FASEB J*; 19(10):1338-40.

Ortiz GG, Macías-Islas MA, Pacheco-Moisés FP, Cruz-Ramos JA, Sustersik S, Barba EA, Aguayo A (2009). Oxidative stress is increased in serum from Mexican patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Dis Markers*; 26(1):35-9.

O'Sullivan SE (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*; 152(5):576-82.

O'Sullivan SE, Sun Y, Bennett AJ, Randall MD, Kendall DA (2009). Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*; 612(1-3):61-8.

O'Sullivan SE, Kendall DA (2010). Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology*; 215(8):611-6.

Padwal RS, Majumdar SR (2007). Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet*; 369(9555):71-7.

Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006). Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J*; 20(13):2405-7.

Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE (2006). Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci*; 119(Pt 2):339-49.

Park E, Velumian AA, Fehlings MG (2004). The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma*; 21(6):754-74.

Parker LA, Rock EM, Limebeer CL (2011). Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids. *Br J Pharmacol*; 163(7):1411-22.

Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET (2000). Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation*; 101(3):235-8.

Pavón FJ, Serrano A, Romero-Cuevas M, Alonso M, de Fonseca FR (2010). Oleoylethanolamide: a new player in peripheral control of energy metabolism. Therapeutic implications. *Drug Discov Today Dis Mech*; 7:175–183.

Perez JH, Branch WJ, Smith L, Mullock BM, Luzio JP (1988). Investigation of endosomal compartments involved in endocytosis and transcytosis of polymeric immunoglobulin A by subcellular fractionation of perfused isolated rat liver. *Biochem J*; 251(3):763-70.

Perras C (2005). Sativex for the management of multiple sclerosis symptoms. *Issues Emerg Health Technol*; (72):1-4.

Perron H, Germi R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, Faucard R, Veas F, Stefan I, Fabrick BO, Van-Horssen J, Van-der-Valk P, Gerdil C, Mancuso R, Saresella M, Clerici M, Marcel S, Creange A, Cavaretta R, Caputo D, Arru G, Morand P, Lang AB, Sotgiu S, Ruprecht K, Rieckmann P, Villoslada P, Chofflon M, Boucraut J, Pelletier J, Hartung HP (2012). Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler*; 18(12):1721-36.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*; 1(3):223-36.

Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*; 74(2):129-80.

Pertwee RG, Ross RA (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 66(2-3):101-21.

Pertwee RG (2004). The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In: Di Marzo V, editor. *Cannabinoids*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp. 32–83.

Pertwee RG (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol*; 152(7):984-6.

Pertwee RG (2008a). Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol*; 13(2):147-59.

Pertwee RG (2008b). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol*; 153(2):199-215.

Pisanu A, Lecca D, Mulas G, Wardas J, Simbula G, Spiga S, Carta AR (2014). Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*; 71:280-91.

Pitt D, Werner P, Raine CS (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med*; 6(1):67-70.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; AFFIRM Investigators (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*; 354(9):899-910.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*; 301(3):1020-4.

Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, Pocock JM, Ledent C, Petzold A, Thompson AJ, Giovannoni G, Cuzner ML, Baker D (2003). Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain*; 126(Pt 10):2191-202.

Pryce G, Riddall DR, Selwood DL, Giovannoni G, Baker D (2015). Neuroprotection in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Progressive Multiple Sclerosis by Cannabis-Based Cannabinoids. *J Neuroimmune Pharmacol*; 10(2):281-92.

Przybyla JA, Watts VJ (2010). Ligand-induced regulation and localization of cannabinoid CB1 and dopamine D2L receptor heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther*; 332(3):710-9.

Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*; 28(24):6231-8.

Raine CS, Cannella B, Duijvestijn AM, Cross AH (1990). Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Lab Invest*; 63(4):476-89.

Rajesh M, Pan H, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Haskó G, Liaudet L, Gao B, Pacher P (2007). Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *J Leukoc Biol*; 82(6):1382-9. Epub 2007 Jul 25.

Ramer R, Heinemann K, Merkord J, Rohde H, Salamon A, Linnebacher M, Hinz B (2013). COX-2 and PPAR- γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*; 12(1):69-82.

Ramirez SH, Haskó J, Skuba A, Fan S, Dykstra H, McCormick R, Reichenbach N, Krizbai I, Mahadevan A, Zhang M, Tuma R, Son YJ, Persidsky Y (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J Neurosci*; 32(12):4004-16.

Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J*; 368(Pt 2):471-81.

Reick C, Ellrichmann G, Thöne J, Scannevin RH, Saft C, Linker RA, Gold R (2014). Neuroprotective dimethyl fumarate synergizes with immunomodulatory interferon beta to provide enhanced axon protection in autoimmune neuroinflammation. *Exp Neurol*; 257:50-6.

Ricci G, Volpi L, Pasquali L, Petrozzi L, Siciliano G (2009). Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *J Biol Phys*; 35(4):317-36.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur GL (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*; 350(2-3):240-4.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Brelière JC, Le Fur GL (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*; 284(2):644-50.

Rockwell CE, Kaminski NE (2004). A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther*; 311(2):683-90.

Rodriguez M, Leibowitz JL, Powell HC, Lampert PW (1983). Neonatal infection with the Daniels strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Lab Invest*; 49(6):672-9.

Rook GA (2012). Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*; 42(1):5-15.

Rose K, Goldberg MP, Choi DW (1993). In vitro biological methods. In: Tyson, CA, Frazier, JM (Eds.), Academic, San Diego, pp. 46-60.

Ross RA, Brockie HC, Fernando SR, Saha B, Razdan RK, Pertwee RG (1998). Comparison of cannabinoid binding sites in guinea-pig forebrain and small intestine. *Br J Pharmacol*; 125(6):1345-51.

Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Lo EH, Montaner J (2006). Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*; 37(6):1399-406.

Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Muzio L, Musella A, Motta C, Studer V, Cavašinni F, Bernardi G, Martino G, Cravatt BF, Lutz B, Maccarrone M, Centonze D (2011). Cannabinoid CB1 receptors regulate neuronal TNF- α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*; 25(6):1242-8.

Rothhammer V, Quintana FJ (2015). Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Semin Immunopathol*; 37(6):625-38.

Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, Casti P, Vargiu R, Pani L (2003). Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*; 306(1):363-70.

Ruiz-Valdepeñas L, Martínez-Orgado JA, Benito C, Millán A, Tolón RM, Romero J (2011). Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: an intravital microscopy study. *J Neuroinflammation*; 8(1):5.

Russo EB, Guy GW, Robson PJ (2007). Cannabis, pain, and sleep: lessons from therapeutic clinical trials of Sativex, a cannabis-based medicine. *Chem Biodivers*; 4(8):1729-43.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*; 152(7):1092-101.

Sánchez AJ, García-Merino A (2012). Neuroprotective agents: cannabinoids. *Clin Immunol*; 142(1):57-67.

Sánchez AJ, González-Pérez P, Galve-Roperh I, García-Merino A (2006). R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)-pyrrolo-[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenyl-methanone (WIN-2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: partial involvement of the CB(2) receptor. *Biochem Pharmacol*; 72(12):1697-706.

Sattler R, Tymianski M (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)*; 78(1):3-13.

Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, et al. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*; 476(7359):214-9.

Sawcer S, Franklin RJ, Ban M (2014). Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol*; 13(7):700-9.

Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF (1997). A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun*; 239(2):543-7.

Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*; 64(2):193-8.

Scherer MT, Ignatowicz L, Winslow GM, Kappler JW, Marrack P (1983). Superantigens: bacterial and viral proteins that manipulate the immune system. *Annu Rev Cell Biol*; 9:101-28.

Schmid PC, Reddy PV, Natarajan V, Schmid HH (1983). Metabolism of N-acyl ethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J Biol Chem*; 258(15):9302-6.

Schilling S, Goelz S, Linker R, Luehder F, Gold R (2006). Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin Exp Immunol*; 145(1):101-7.

Schmidt HH, Warner TD, Nakane M, Förstermann U, Murad F (1992). Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7 macrophages. *Mol Pharmacol*; 41(4):615-24.

Schütz B, Reimann J, Dumitrescu-Ozimek L, Kappes-Horn K, Landreth GE, Schürmann B, Zimmer A, Heneka MT (2005). The oral antidiabetic pioglitazone protects from neurodegeneration and amyotrophic lateral sclerosis-like symptoms in superoxide dismutase-G93A transgenic mice. *J Neurosci*; 25(34):7805-12.

Scott LJ (2011). Fingolimod: a review of its use in the management of relapsing-remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs*; 25(8):673-98.

Sellner J, Koczi W, Harrer A, Oppermann K, Obregon-Castrillo E, Pilz G, Wipfler P, Afazel S, Haschke-Becher E, Trinkka E, Kraus J (2013). Glatiramer acetate attenuates the pro-migratory profile of adhesion molecules on various immune cell subsets in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*; 173(3):381-9.

Sharir H, Abood ME. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther*. 2010 Jun;126(3):301-13.

Shen M, Thayer SA (1998). Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol Pharmacol*; 54(3):459-62.

Sim-Selley LJ, Brunk LK, Selley DE. Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 2001 Mar 2;414(2-3):135-43.

Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):933-46.

Smart D, Jerman JC. Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Apr;21(4):134.

Smith KJ, Kapoor R, Felts PA (1999). Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol*; 9(1):69-92.

Smith TH, Sim-Selley LJ, Selley DE (2010). Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: novel targets for central nervous system drug discovery? *Br J Pharmacol*; 160(3):454-66.

Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther*. 2007 Apr;114(1):13-33.

Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2006 Jul;60(1):12-21.

Stella N (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*; 48(4):267-77.

Stover JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Lowitzsch K, Kempfski OS (1997). Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest*; 27(12):1038-43.

Straus Farber R, Harel A, Lublin F (2016). Novel Agents for Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Med*; 67:309-21.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Oct 4;215(1):89-97.

Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*. 2006 Sep;45(5):405-46.

Sugiura T, Waku K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem.* 2002 Jul;132(1):7-12.

Suna S, Sakata Y, Sato H, Mizuno H, Nakatani D, Shimizu M, Usami M, Takashima S, Takeda H, Hori M (2008). Up-regulation of cell adhesion molecule genes in human endothelial cells stimulated by lymphotoxin alpha: DNA microarray analysis. *J Atheroscler Thromb*; 15(3):160-5.

Swendsen KB, Jensen TS, Bach FW. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ.* 2004 Jul 31;329(7460):253.

Szalardy L, Zadori D, Tanczos E, Simu M, Bencsik K, Vecsei L, Klivenyi P (2013). Elevated levels of PPAR-gamma in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett*; 554:131-4.

Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol.* 1971 Aug;1(4):242-8.

Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012 May;18(5):552-6.

Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C, Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis--the long road to clinical application. *Nat Rev Neurol.* 2015 Oct;11(10):585-96.

Theiler M. Spontaneous encephalomyelitis of mice—A new virus disease. *Science.* 1934 Aug 3;80(2066):122.

Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007 Mar;150(5):613-23.

Tomiyama K, Funada M (2014). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*; 274(1):17-23.

Touw M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs.* 1981 Jan-Mar;13(1):23-34.

Trapp BD, Nave KA (2008). Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*; 31:247-69.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*; 338(5):278-85.

Tsunoda I, Fujinami RS (1996). Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Neuropathol Exp Neurol*; 55(6):673-86.

Valdeolivas S, Navarrete C, Cantarero I, Bellido ML, Muñoz E, Sagredo O (2015). Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington's disease: studies in R6/2 mice and 3-nitropropionate-lesioned mice. *Neurotherapeutics*; 12(1):185-99.

Van den Elsen PJ, van Eggermond MC, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S (2014). The epigenetics of multiple sclerosis and other related disorders. *Mult Scler Relat Disord*; 3(2):163-75.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyanis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 2005 Oct 14;310(5746):329-32.

Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Díaz-Laviada I. Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*. 2013 May 2;4:e618.

Velasco G, Sánchez C, Guzmán M (2012). Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer*; 12(6):436-44.

Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Álvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*. 2002 Aug 27;59(4):555-9.

Villar LM, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, de Andrés C, Izquierdo G, Arroyo R, Avşar T, Lapin SV, Johnson T, Montalbán X, Fernández O, Álvarez-Lafuente R, Masterman D, García-Sánchez MI, Coret F, Siva A, Evdoshenko E, Álvarez-Cermeño JC, Bar-Or A. Immunoglobulin M oligoclonal bands: biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2014 Aug;76(2):231-40.

Wade DT, Makela P, Robson P, House H, Bateman C. Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. *Mult Scler*. 2004 Aug;10(4):434-41.

Waisman A, Korn T. B cells assume the command. *Sci Transl Med*. 2015 Oct 21;7(310):310fs42.

Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA (1999). The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther*; 288(3):1357-66.

Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM, Stemerman MB (2002). Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*; 277(37):34176-81.

Wang T, Collet JP, Shapiro S, Ware MA. Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *CMAJ*. 2008 Jun 17;178(13):1669-78.

Wen J, Ribeiro R, Tanaka M, Zhang Y (2015). Activation of CB2 receptor is required for the therapeutic effect of ABHD6 inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropharmacology*; 99:196-209.

Werner P, Pitt D, Raine CS (2001). Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol*; 50(2):169-80.

Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):12877-82.

Wilson RI, Nicoll RA (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*; 410(6828):588-92.

Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1368-79.

Wirgin I, Mechoulam R, Breuer A, Schezen E, Weidenfeld J, Brenner T (1994). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by cannabinoids. *Immunopharmacology*; 28(3):209-14.

Wissel J, Haydn T, Müller J, Brenneis C, Berger T, Poewe W, Schelosky LD. Low dose treatment with the synthetic cannabinoid Nabilone significantly reduces spasticity-related pain: a double-blind placebo-controlled cross-over trial. *J Neurol*. 2006 Oct;253(10):1337-41.

Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, Straiker A, Spencer C, Bradshaw H, Mackie K, Lu HC. GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One*. 2013;8(4):e60314.

Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992 Mar 5;356(6364):63-6.

Yi JH, Park SW, Brooks N, Lang BT, Vemuganti R (2008). PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic brain injury via anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. *Brain Res*; 1244:164-72.

Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol*; 6:12.

Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ (2002). Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev*; 22(2):146-67.

Zajicek J, Ball S, Wright D, Vickery J, Nunn A, Miller D, Gomez Cano M, McManus D, Mallik S, Hobart J; CUPID investigator group. Effect of dronabinol on progression in progressive multiple sclerosis (CUPID): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2013 Sep;12(9):857-65.

Zameer A, Hoffman SA (2003). Increased ICAM-1 and VCAM-1 expression in the brains of autoimmune mice. *J Neuroimmunol*; 142(1-2):67-74.

Zhang Z, Zhang R (2015). Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy. *Autoimmun Rev*; 14(10):854-63.

Zhao X, Ou Z, Grotta JC, Waxham N, Aronowski J (2006). Peroxisome-proliferator-activated Receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain Res*; 1073-1074:460-9.

Zhao Y, Yuan Z, Liu Y, Xue J, Tian Y, Liu W, Zhang W, Shen Y, Xu W, Liang X, Chen T (2010). Activation of cannabinoid CB2 receptor ameliorates atherosclerosis associated with suppression of adhesion molecules. *J Cardiovasc Pharmacol*; 55(3):292-8.

Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Nov 3;12(12):723-38.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999 Jul 29;400(6743):452-7.

VIII. *Anexos*

Anexo 1

Curriculum vitae del doctorando

Anexo 2

Artículo original titulado **“A Cannabigerol Quinone Alleviates Neuroinflammation in a Chronic Model of Multiple Sclerosis”**

Publicado en J Neuroimmune Pharmacol; 7(4):1002-16.
DOI 10.1007/s11481-012-9399-3.

Anexo 3

Artículo original titulado **“A cannabigerol derivative suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis”**

Publicado en PLOS ONE; 9(4):e94733.
DOI 10.1371/journal.pone.0094733.